



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1798766 B

(45) 授权公告日 2012. 05. 30

(21) 申请号 200480015071. 3

A61K 39/395 (2006. 01)

(22) 申请日 2004. 06. 01

A61K 39/40 (2006. 01)

A61K 39/42 (2006. 01)

(30) 优先权数据

60/474, 654 2003. 05. 30 US

(56) 对比文件

WO 02088306 A, 2002. 11. 07, 全文.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2005. 11. 30

Frederic Riquie Bard, Robin Barbour, Catherine Cannon, Robert Carretto, Michael Fox, Dora Games, Teresa Guido, Kathleen Hoenow, Kang Hu, Kelly Johnson-Wood, Karen Khan, Dora Kholodenko, Celeste Lee, Mike Lee, Ruth Motter, Minh Nguyen, Amanda Reed, Dale Schenk, Pearl Tang, Nicki Vasquez, Peter Seubert, and Ted Yednock.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/US2004/017514 2004. 06. 01

Epitope and isotype specificities of antibodies to β amyloid peptide for protection against Alzheimer's disease-like neuropathology. PNAS 100 4. 2003, 100 (4), 2023-2028.

(87) PCT 申请的公布数据

WO2004/108895 EN 2004. 12. 16

(73) 专利权人 杨森阿尔茨海默氏症免疫治疗公司

地址 爱尔兰都柏林

专利权人 惠氏有限责任公司

审查员 于群

(72) 发明人 古里奇·巴锡

乔斯·W·萨尔达尼亚

弗雷德里克·巴尔德

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限公司 11219

代理人 杨青 樊卫民

(51) Int. Cl.

C07K 16/00 (2006. 01)

C07K 17/00 (2006. 01)

C12P 21/08 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 53 页

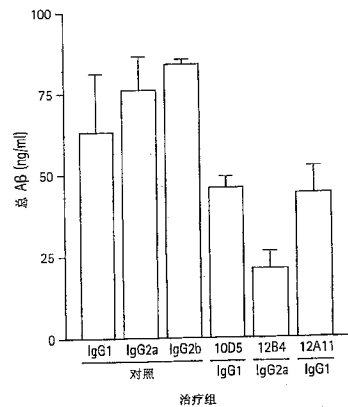
序列表 17 页 附图 13 页

(54) 发明名称

识别 β -淀粉样肽的人源化抗体

(57) 摘要

本发明提供了改进的试剂和方法, 用于治疗与病人脑中的 A β 淀粉样沉积有关的疾病。优选的试剂包括抗体, 例如人源化抗体。



1. 结合抗原或与完整抗体竞争与抗原的结合的人源化 12A11 抗体,其中 12A11 是小鼠抗体,所述 12A11 的特征为 SEQ ID NO:2 的轻链可变区,和 SEQ ID NO:4 的重链可变区,所述人源化抗体包括特异性结合 β 淀粉样肽的含有 SEQ ID NO:2 的三个轻链 CDR 的人源化轻链可变区以及含有 SEQ ID NO:4 的三个重链 CDR 的人源化重链可变区。

2. 权利要求 1 的人源化抗体,其中的人源化轻链可变区框架与登录号 BAC01733 的来自人亚群 II 抗体 K64(AIMS4) 的人轻链可变区框架具有至少 85% 的序列同一性。

3. 权利要求 1 的人源化抗体,其中的人源化重链可变区框架与登录号 AAA69734 的来自人亚群 III 抗体 M72 的人重链可变区框架具有至少 85% 的序列同一性。

4. 权利要求 1 的人源化 12A11 抗体,其包含人源化重链和人源化轻链,其中

(a) 人源化轻链包括具有来自 SEQ ID NO:2 所示的小鼠 12A11 免疫球蛋白轻链可变结构域的相应互补决定区的氨基酸序列的 3 个互补决定区 CDR1, CDR2 和 CDR3,以及来自 SEQ ID NO:8 所示人轻链可变区框架序列的可变区框架;以及

(b) 人源化重链包括具有来自 SEQ ID NO:4 所示的小鼠 12A11 免疫球蛋白重链可变结构域的相应互补决定区的氨基酸序列的 3 个互补决定区 CDR1, CDR2 和 CDR3,以及来自 SEQ ID NO:11 所示人重链可变区框架序列的可变区框架,条件是选自根据 Kabat 编号规则的 H24, H28, H29, H37, H48, H67, H71, H73 和 H78 的至少一个位置被小鼠 12A11 免疫球蛋白重链可变区框架的等价位置存在的相同氨基酸残基占据;

其中人源化抗体与 β 淀粉样肽特异性结合的结合亲和性至少为 $10^7 M^{-1}$,其中小鼠 12A11 免疫球蛋白具有可变结构域为 SEQ ID NO:2 的轻链以及可变结构域为 SEQ ID NO:4 的重链。

5. 权利要求 4 的人源化抗体,其中人源化可变区轻链为 SEQ ID NO:7。

6. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H28, H29, H37, H48, H67, H71, H73 和 H78 分别被 F, S, L, I, L, L, K, T 和 V 占据。

7. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H29, H37, H71 和 H73 分别被 F, L, I, K 和 T 占据。

8. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H29, H37 和 H71 分别被 F, L, I 和 K 占据。

9. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H29 和 H37 分别被 F, L 和 I 占据。

10. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H29, H37, H48, H67, H71, H73 和 H78 分别被 F, L, I, L, L, K, T 和 V 占据。

11. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H28, H29, H37, H67, H71, H73 和 H78 分别被 F, S, L, I, L, K, T 和 V 占据。

12. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H28, H29, H37, H48, H71, H73 和 H78 分别被 F, S, L, I, L, K, T 和 V 占据。

13. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H28, H29, H37, H48, H67, H71 和 H73 分别被 F, S, L, I, L, L, K 和 T 占据。

14. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区

框架位置 H24, H29, H37, H67, H71, H73 和 H78 分别被 F, L, I, L, K, T 和 V 占据。

15. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H29, H37, H48, H71, H73 和 H78 分别被 F, L, I, L, K, T 和 V 占据。

16. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H29, H37, H48, H67, H71 和 H73 分别被 F, L, I, L, L, K 和 T 占据。

17. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H28, H29, H37, H71, H73 和 H78 分别被 F, S, L, I, K, T 和 V 占据。

18. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H28, H29, H37, H67, H71 和 H73 分别被 F, S, L, I, L, K 和 T 占据。

19. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H28, H29, H37, H48, H71 和 H73 分别被 F, S, L, I, L, K 和 T 占据。

20. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H29, H37, H71, H73 和 H78 分别被 F, L, I, K, T 和 V 占据。

21. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H29, H37, H67, H71 和 H73 分别被 F, L, I, L, K 和 T 占据。

22. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H29, H37, H48, H71, H73 和 H78 分别被 F, L, I, L, K, T 和 V 占据。

23. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H28, H29, H37, H71 和 H73 分别被 F, S, L, I, K 和 T 占据。

24. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H29, H48, H67, H71, H73 和 H78 分别被 F, L, L, L, K, T 和 V 占据。

25. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中根据 Kabat 编号规则的人源化重链可变区框架位置 H24, H28, H29, H37, H48, H67, H71 和 H78 分别被 F, S, L, I, L, L, K 和 V 占据。

26. 权利要求 1-4 任一项的人源化抗体,其中的人源化重链可变区具有包括 SEQ ID NO:10 的氨基酸 1-120 的氨基酸序列,以及具有包括 SEQ ID NO:7 的氨基酸 1-112 的氨基酸序列。

27. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中的人源化重链可变区具有包括选自 SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:27 和 SEQ ID NO:28 的序列的氨基酸 1-120 的氨基酸序列;并且其中人源化轻链可变区具有包括 SEQ ID NO:7 的氨基酸 1-112 的氨基酸序列。

28. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中的人源化重链可变区具有包括选自 SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14 和 SEQ ID NO:15 的序列的氨基酸 1-120 的氨基酸序列;并且其中人源化轻链可变区具有包括 SEQ ID NO:7 的氨基酸 1-112 的氨基酸序列。

29. 权利要求 1 的人源化抗体,其中的人源化重链可变区具有包括 SEQ ID NO:22 或 SEQ ID NO:23 的氨基酸 1-121 的氨基酸序列;并且其中人源化轻链可变区具有包括 SEQ ID NO:7 的氨基酸 1-112 的氨基酸序列。

30. 权利要求 1-5 任一项的人源化抗体,其中同种型是 $\gamma 1$ 。

31. 一种分离的核酸,分别编码权利要求 1-29 任一项的人源化重链可变区和权利要求 1-5 任一项的人源化轻链可变区。

32. 一种或者多种载体,含有权利要求 31 的一种或者多种核酸。
33. 一种分离的宿主细胞,含有权利要求 32 的一种或者多种载体。
34. 一种生产人源化抗体的方法,包括在产生抗体的条件下培养权利要求 33 的宿主细胞,以及从宿主细胞或培养物中分离该抗体。
35. 一种药物组合物,包括权利要求 1-30 任一项的人源化抗体以及药用载体。
36. 结合抗原或与完整抗体竞争与抗原的结合的嵌合抗体 12A11,其中 12A11 是小鼠抗体,特征为 SEQ ID NO:2 的轻链可变区以及 SEQID NO:4 的重链可变区。
37. 权利要求 1-28 任一项的人源化抗体在制备用于治疗或预防致淀粉样疾病的药物中的应用。
38. 权利要求 37 的应用,其中致淀粉样疾病是阿茨海默病。
39. 权利要求 37 或 38 的应用,其中的剂量在 0.01 至 5mg/kg 体重的范围内。
40. 权利要求 37 的应用,其中的剂量为 1mg/kg 体重。

识别 β -淀粉样肽的人源化抗体

[0001] 相关的申请

[0002] 本申请要求以前在先提交的临时专利申请 U. S. No. 60/474, 654 (2003 年 5 月 30 日提交) 的优先权, 该申请的发明名称是“识别 β -淀粉样肽的人源化抗体”。上面引用的申请的全部内容在此引为参考。

[0003] 发明背景

[0004] 阿茨海默氏病 (AD) 是一种进行性疾病, 可以引起老年痴呆。参见: Selkoe, TINS 16:403(1993); Hardy 等, WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53:438(1994); Duff 等, Nature 373:476(1995); Games 等, Nature 373:523(1995)。从广义来说, 这种疾病分为两类: 在老龄 (65 岁以上) 发作的晚期发病型和老年期以前, 即 35 岁到 60 岁之间就完全发展的早期发病型。在这两种类型的疾病中, 病理学是相同的, 但是在较早年龄开始发病的情况下, 异常会趋于更加严重和广泛。该病的特征是在脑中至少有两种类型的损害, 神经纤维缠结和老年斑。神经纤维缠结是与 τ 蛋白相关的微管的细胞内沉积, 该蛋白由两根成对的互相缠绕的纤丝组成。老年斑 (即淀粉样斑) 是被打乱的神经纤维网的区域, 它覆盖着位于中心的细胞外淀粉样沉积物, 可达 150 μ m, 在脑组织切片的显微镜分析时可以看到。淀粉样斑在脑中的积累也与 Down 氏综合症和其它认知紊乱有关。

[0005] 斑的基本组成成分是一种被称为 A β 或 β -淀粉样肽的肽。A β 肽是一种被称为淀粉样前体蛋白 (APP) 的较大的跨膜糖蛋白中含有 39-43 个氨基酸的内部片段, 大小约为 4-kDa。作为 APP 被不同的分泌酶进行蛋白水解加工的结果, 最初发现的 A β 有两种形式, 短的形式长度为 40 个氨基酸, 而长的形式长度为 42-43 个氨基酸。在 A β 的羧基端发现了 APP 的疏水跨膜结构域的一部分, 这可解释 A β , 特别是长形式的 A β 在斑中聚集的能力。淀粉样斑在脑中的积累最终导致神经元细胞的死亡。与这种类型的神经元退化有关的身体症状是阿茨海默氏病的特点。

[0006] APP 蛋白中的几个突变已经与阿茨海默氏病的出现相关联。参见例如 Goate 等, Nature 349:704(1991) (717 位的缬氨酸变为异亮氨酸); Chartier Harlan 等, Nature 353:844(1991) (717 位的缬氨酸变为甘氨酸); Murrell 等, Science 254:97(1991) (717 位的缬氨酸变为苯丙氨酸); Mullan 等, Nature Genet. 1:345(1992) (双突变, 595 位的赖氨酸和 596 位的甲硫氨酸变为 595 位的天冬酰胺和 596 位的亮氨酸)。这些突变被认为通过增加或改变从 APP 到 A β 的加工, 特别是从 APP 到增量的长形式的 A β (即 A β 1-42 和 A β 1-43) 的加工而引起阿茨海默氏病。其它基因, 例如早老素 (presenilin) 基因 PS1 和 PS2 的突变, 被认为间接地影响了 APP 的加工, 从而产生了增量的长形式 A β (参见 Hardy, TINS 20:154(1997))。

[0007] 小鼠模型已经被成功地用来确定淀粉样斑在阿茨海默氏病中的重要性 (Games 等, 同上; Johnson-Wood 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:1550(1997))。具体来说, 当用长形式的 A β 注射 PDAPP 转基因小鼠 (该小鼠表达突变形式的人 APP, 并在幼龄时就发展出阿茨海默氏病) 时, 它们表现出阿茨海默氏病发展的减慢和针对 A β 肽抗体滴度的增加 (Schenk 等, Nature 400:173(1999))。上面讨论的观察表明 A β , 特别是它的长形式, 是阿

茨海默氏病的一个病因。

[0008] 因此,存在着对治疗阿茨海默氏病的新疗法和药剂,特别是能够在生理(例如非毒性)剂量下实现治疗效果的疗法和药剂的需求。

[0009] 发明简述

[0010] 本发明的特征在于新的免疫药剂,具体来说预防和治疗生成淀粉样疾病(例如阿茨海默氏病)的治疗性抗体药剂。本发明至少部分地基于单克隆抗体 12A11 的识别和表征,该抗体与 A β 肽特异性结合,有效地减少了与生成淀粉样紊乱有关的斑负荷。对该抗体的结构和功能的分析导致设计了各种人源化抗体用于预防和/或治疗。具体来说,本发明的特征在于对该抗体的可变区进行人源化,从而提供了所述抗体的人源化免疫球蛋白或抗体链、完整的人源化免疫球蛋白或抗体以及功能性免疫球蛋白或抗体片段,特别是抗原结合片段。

[0011] 含有所述单克隆抗体的互补决定区(CDR)的多肽也被公开了,适合于编码该多肽的多核苷酸试剂、载体和宿主细胞也被公开。

[0012] 还公开了生成淀粉样疾病或紊乱(例如阿茨海默氏病)的治疗方法,以及其中使用的药物组合物和试剂盒。

[0013] 本发明的特征为在所述单克隆抗体中对于适当的免疫功能来说是重要的残基的鉴定方法,以及在设计具有改善的结合亲和性和/或减少的免疫原性的人源化抗体中在用作治疗药剂时适合取代的残基的鉴定方法。

[0014] 本发明的特征还在于具有改变的效应子功能的抗体及其治疗应用。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 图示实验结果,所述实验检查各种不同的抗体,包括 12A11,在离体吞噬分析中对清除 A β 斑的效果。

[0017] 图 2 图示实验结果,所述实验检查各种不同的抗体,包括 12A11,对减少总 A β 水平的效果。长方形代表中值,而水平虚线显示对照水平。图 2B 图示实验结果,所述实验分析各种不同的抗体,包括 12A11,对减少神经性营养不良的效果。长方形代表中值,而水平虚线显示对照水平。数据以单个动物示出,并表示成相对于对照的平均值(设定为 100%)神经性营养不良的百分比。

[0018] 图 3A 描述了包括鼠 12A11 VL 链序列的 DNA 序列,以及推论的 VL 链的氨基酸序列(分别为 SEQ ID NOs :5 和 2)。成熟 VL 链以实体黑色长方形显示。CDRs 以空心长方形显示。图 3B 描述了包括鼠 12A11 VH 链序列的 DNA 序列,以及推论的 VH 链的氨基酸序列(分别为 SEQ ID NOs :6 和 3)。成熟 VH 链以实体黑色长方形显示。CDRs 以空心长方形显示。DNA 序列包括克隆位点和 Kozak 序列(编码序列的上游)和剪接和克隆序列(下游)。

[0019] 图 4 图示实验的 ELISA 结果,所述实验测量嵌合 12A11,嵌合和人源化 3D6,和嵌合和人源化 12B4 与 A β 1-42 结合。

[0020] 图 5A 描述了鼠(或嵌合)12A11(SEQ ID NO :2),人源化 12A11(成熟肽,SEQ ID NO :7),GenBank BAC01733(SEQ ID NO :8)和种系 A19(X63397,SEQ ID NO :9)抗体轻链的氨基酸序列的比对。CDR 区以盒框表示。装配残基以下划线表示。编号从第 1 个甲硫氨酸开始,而非 Kabat 编号。图 5B 描述了鼠(或嵌合)12A11(SEQ ID NO :4),人源化 12A11(版本 1)(成熟肽,SEQ ID NO :10),GenBank AAA69734(SEQ ID NO :11)和种系 GenBank 567123

抗体 (SEQ ID NO :12) 重链的氨基酸序列的比对。装配残基以下划线表示, 典型残基以实体填充, 而微调残基以虚线填充。编号从第 1 个甲硫氨酸开始, 而非 Kabat 编号。

[0021] 图 6A-B 描述人源化 12A11 v1 (SEQ ID NO :10), v2 (SEQ ID NO :13), v2.1 (SEQ ID NO :14), v3 (SEQ ID NO :15), v4.1 (SEQ ID NO :16), v4.2 (SEQ ID NO :17), v4.3 (SEQ ID NO :18), v4.4 (SEQ ID NO :19), v5.1 (SEQ ID NO :20), v5.2 (SEQ ID NO :21), v5.3 (SEQ ID NO :22), v5.4 (SEQ ID NO :23), v5.5 (SEQ ID NO :24), v5.6 (SEQ ID NO :25), v6.1 (SEQ ID NO :26), v6.2 (SEQ ID NO :27), v6.3 (SEQ ID NO :28), v6.4 (SEQ ID NO :29), v7 (SEQ ID NO :30) 和 v8 (SEQ ID NO :31) 的重链的氨基酸序列的比对。图 6C 阐述人源化 12A11 v1 至 v8 中所做的回复突变。

[0022] 图 7 描述了聚集 A β (1-42) ELISA 的结果, 比较嵌合 12A11, 人源化 12A11 v1, 人源化 12A11 v2, 人源化 12A11 v2.1, 和人源化 12A11 v3。

[0023] 图 8 描述了竞争性 A β 1-42 ELISA 结合分析的结果, 比较鼠 12A11, 嵌合 12A11 和 h12A11 v1。

[0024] 发明详述

[0025] 本发明的特征在于用于预防或治疗阿茨海默氏病或其它生成淀粉样疾病的新的免疫药剂和方法。本发明至少部分地基于单克隆免疫球蛋白 12A11 的下列特征: 有效地结合 β 淀粉样蛋白 (A β) (例如结合可溶性的和 / 或聚集的 A β)、介导吞噬作用 (例如聚集的 A β 的吞噬作用)、减少斑负荷和 / 或减少神经性营养不良 (例如在病人中)。本发明还基于对 12A11 免疫球蛋白的轻链可变区和重链可变区的一级和二级结构的确定及结构特征, 以及对活性和免疫原性重要的残基的鉴定。

[0026] 免疫球蛋白的特征在于包括了此处描述的 12A11 单克隆免疫球蛋白的轻链可变区和 / 或重链可变区。优选的免疫球蛋白, 例如治疗性免疫球蛋白的特点在于包括了人源化的轻链可变区和 / 或人源化的重链可变区。优选的轻链可变区和 / 或重链可变区包括了来自 12A11 免疫球蛋白 (例如供体免疫球蛋白) 的互补决定区 (CDR) 和或来自基本上来自人类受体免疫球蛋白的可变框架区。词组“基本上来自人类受体免疫球蛋白”意味着大部分或关键的框架残基来自于人类受体序列, 但是允许在某些位置的残基用被选择用来改善人源化免疫球蛋白的活性 (例如改变活性以便更接近地模仿供体免疫球蛋白的活性) 的残基、或被选择用来减少人源化免疫球蛋白的免疫原性的残基所取代。

[0027] 在一个实施方案中, 本发明的特征在于人源化免疫球蛋白的轻链或重链, 它包括 12A11 可变区互补决定区 (CDRs) (即包括一个、两个或三个来自 SEQ ID NO :2 所显示的轻链可变区序列的 CDRs, 或包括一个、两个或三个来自 SEQ ID NO :4 所显示的重链可变区序列的 CDRs), 还包括来自人类受体免疫球蛋白轻链或重链序列的可变框架区, 任选框架残基中至少一个残基回复突变为相应的鼠的残基, 其中 该回复突变基本上不影响链指导 A β 结合的能力。

[0028] 在一个实施方案中, 本发明的特征在于人源化免疫球蛋白的轻链或重链, 它包括 12A11 可变区互补决定区 (CDRs) (即包括一个、两个或三个来自 SEQ ID NO :2 所显示的轻链可变区序列的 CDRs, 或包括一个、两个或三个来自 SEQ ID NO :4 所显示的重链可变区序列的 CDRs), 还包括来自人类受体免疫球蛋白轻链或重链序列的可变框架区, 任选框架残基中至少一个残基回复突变为相应的鼠的残基, 其中该回复突变基本上不影响链指导 A β 结

合的能力。

[0029] 在另一个实施方案中,本发明的特征在于人源化免疫球蛋白的轻链或重链,它包括 12A11 可变区互补决定区 (CDRs) (例如包括一个、两个或三个来自 SEQ ID NO:2 所显示的轻链可变区序列的 CDRs,和/或包括一个、两个或三个来自 SEQ ID NO:4 所显示的重链可变区序列的 CDRs),还包括基本上来自人类受体免疫球蛋白轻链或重链序列的可变框架区,任选至少一个框架残基被小鼠 12A11 轻链或重链可变区序列中相应的氨基酸残基所取代,其中该框架残基选自:(a) 直接非共价结合抗原的残基;(b) 临近 CDR 的残基;(c) 与 CDR 相互作用的残基(例如,通过对同源的已知免疫球蛋白链的已解析结构上的轻链或重链建立模型而鉴定);以及 (d) 参与 VL-VH 界面的残基。

[0030] 在另一个实施方案中,本发明的特征在于人源化免疫球蛋白的轻链或重链,它包括 12A11 可变区 CDRs 和来自人类受体免疫球蛋白轻链或重链序列的可变框架区,任选至少一个框架残基被小鼠 12A11 轻链或重链可变区序列中相应的氨基酸残基所取代,其中该框架残基是正如通过可变区的三维模型分析所鉴定的能够影响轻链可变区构象或功能的残基,例如是能够与抗原相互作用的残基、靠近抗原结合位点的残基、能够与 CDR 相互作用的残基、临近某个 CDR 的残基、距离 CDR 残基 6Å 以内的残基、典型序列的残基、微调区残基、链间装配的残基、稀有残基、或者在结构模型表面上的糖基化位点残基。

[0031] 在另一个实施方案中,除了上述的取代之外,本发明的特征还在于至少一个稀有人类框架残基的取代。例如,稀有残基可以被在该位点对于人类可变链序列来说常见的氨基酸残基所取代。此外,稀有残基可以被同源的种系可变链序列的相应氨基酸残基所取代。

[0032] 在另一个实施方案中,本发明的特征在于如上所述包括轻链和重链的人源化免疫球蛋白,或该免疫球蛋白的抗原结合片段。在一个示例的实施方案中,人源化免疫球蛋白与 β 淀粉样肽 (A β) 结合(例如特异性结合)的亲和性至少为 10^7M^{-1} 、 10^8M^{-1} 或 10^9M^{-1} 。在另一个实施方案中,免疫球蛋白或抗原结合片段包括具有同种型 $\gamma 1$ 的重链。在另一个实施方案中,免疫球蛋白或抗原结合片段与可溶性的 β 淀粉样肽 (A β) 和聚集的 A β 都能结合(例如特异性结合)。在另一个实施方案中,免疫球蛋白或其抗原结合片段捕获可溶性 A β (例如,可溶性 A β 1-42)。在另一个实施方案中,免疫球蛋白或抗原结合片段介导了 β 淀粉样肽 (A β) 的吞噬作用(例如诱导吞噬作用)。在另一个实施方案中,免疫球蛋白或抗原结合片段通过个体中的血脑屏障。在另一个实施方案中,免疫球蛋白或抗原结合片段在对象中减少了 β 淀粉样肽 (A β) 负荷和神经性营养不良。

[0033] 在另一个实施方案中,本发明的特征在于包括 12A11 可变区(例如在 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:4 中显示的可变区序列)的嵌合免疫球蛋白。在另一个实施方案中,免疫球蛋白或其抗原结合片段还包括来自 IgG1 的恒定区。

[0034] 此处描述的免疫球蛋白特别适用于旨在防止或治疗生成淀粉样疾病的治疗方法。在一个实施方案中,本发明的特征在于一种防止或治疗生成淀粉样疾病(例如阿茨海默氏病)的方法,其中包括给患者给药有效剂量的此处描述的人源化免疫球蛋白。在另一个实施方案中,本发明的特征在于包括此处描述的人源化免疫球蛋白和可药用载体的药物组合物。本发明的特征还有用于生产此处描述的免疫球蛋白或免疫球蛋白片段或链的分离的核酸分子、载体和宿主细胞,以及生产该免疫球蛋白、免疫球蛋白片段或免疫球蛋白链的方法。

[0035] 本发明的特征还在于一种方法,用于鉴定那些在产生人源化 12A11 免疫球蛋白时分别适合取代的 12A11 残基。例如,一种鉴定那些适合取代的可变框架区残基的方法包括在已经解析的同源免疫球蛋白结构的基础上建立 12A11 可变区的三维结构模型,以及分析该模型中能够影响 12A11 免疫球蛋白可变区构象或功能的残基,从而鉴定出适合取代的残基。本发明的进一步特征是使用 SEQ ID NO:2 或 SEQ IDNO:4 中显示的可变区序列或其任何部分,来产生 12A11 免疫球蛋白、12A11 免疫球蛋白链或其结构域的三维图象。

[0036] 本发明的特征还在于一些免疫球蛋白,它们具有改变了的效应子功能,例如结合效应器分子如效应细胞上的补体或受体的能力。具体来说,本发明的免疫球蛋白具有改变了的恒定区例如 Fc 区,其中在 Fc 区中至少一个氨基酸残基被不同的残基或侧链所取代。在一个实施方案中,修饰的免疫球蛋白是 IgG 类的,在 Fc 区至少含有一个氨基酸取代,以便与例如未修饰的免疫球蛋白相比该免疫球蛋白具有改变了的效应子功能。在特定的实施方案中,本发明的免疫球蛋白具有改变了的效应子功能,以便它具有较低的免疫原性(例如不激活不需要的效应细胞活性、裂解作用或补体结合性质)、改善的淀粉体清除性质、和/或具有所需的半衰期。

[0037] 在描述本发明之前,给出在本文中所用的某些术语的定义对于理解本发明可能是有帮助的。

[0038] 术语“免疫球蛋白”或“抗体”(在此可以互换使用)是指一种具有基本的四条多肽链结构的蛋白,由两条重链和两条轻链组成,这些链通过例如链间的二硫键被稳定化,它具有特异性结合抗原的能力。术语“单链免疫球蛋白”或“单链抗体”(在此可以互换使用)是指一种具有两条多肽链结构的蛋白,由一条重链和一条轻链组成,这些链通过例如链间的肽键被稳定化,它具有特异性结合抗原的能力。术语“结构域”是指一种重链或轻链多肽的球状区域,其中含有肽环(例如含有 3 到 4 个肽环),它们通过例如 β -折叠片层和/或链间二硫键被稳定化。结构域在此还被称为“恒定的”或“可变的”,这是根据在“恒定的”结构域的情况下不同类成员的结构域中相对缺少序列变化,或在“可变的”结构域的情况下不同类成员的结构域中有显著变化。抗体或多肽“结构域”在本领域内经常可以与抗体或多肽“区”互换使用。抗体轻链的“恒定的”结构域可以与“轻链恒定区”、“轻链恒定结构域”、“CL”区或“CL”结构域互换使用。抗体重链的“恒定的”结构域可以与“重链恒定区”、“重链恒定结构域”、“CH”区或“CH”结构域互换使用。抗体轻链的“可变的”结构域可以与“轻链可变区”、“轻链可变结构域”、“VL”区或“VL”结构域互换使用。抗体重链的“可变的”结构域可以与“重链恒定区”、“重链恒定结构域”、“VH”区或“VH”结构域互换使用。

[0039] 术语“区”也可以指抗体链或抗体链结构域的一个部分(例如此处定义的重链或轻链的一个部分或恒定的或可变的结构域的一个部分),以及该链或结构域的更为分散的部分。例如轻链和重链或轻链和重链可变结构域包括如本发明所定义的在“框架区域”或“FRs”间分隔分布的“互补决定区”或“CDRs”。

[0040] 免疫球蛋白或抗体可以以单体或多聚体的形式存在,例如 IgM 抗体以五聚体形式存在,和/或 IgA 抗体以单体、二聚体或多聚体形式存在。术语“片段”是指抗体或抗体链的一个部分,其中含有比完整或完全的抗体或抗体链更少的氨基酸残基。片段可以通过用化学法或酶法处理完整或完全的抗体或抗体链而获得。片段也可以通过重组的方法获得。示例的片段包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和/或 Fv 片段。术语“抗原结合片段”是指免疫球蛋

白或抗体中的多肽片段,它结合抗原或和完整抗体(即与衍生得到它们的完整抗体)竞争与抗原的结合(即特异性结合)。

[0041] 术语“构象”是指蛋白或多肽(例如抗体、抗体链、结构域或其区域)的三级结构。例如,词组“轻链(或重链)构象”是指轻链(或重链)可变区的三级结构,而词组“抗体构象”或“抗体片段构象”是指抗体或其片段的三级结构。

[0042] 抗体的“特异性结合”意味着抗体对特定抗原或表位表现出明显的亲和性,并且一般情况下不表现出明显的交叉反应性。在举例的实施方案中,抗体未显现交叉反应性(例如,没有与非-A β 肽或与A β 上的远程表位交叉反应)。“明显的”或优选的结合包括结合的亲和性至少为 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9M^{-1} 或 10^{10}M^{-1} 。优选的是亲和性大于 10^7M^{-1} ,更优选为大于 10^8M^{-1} 。位于这里提出的数值中间的数值也包括在本发明的范围之内,优选的结合亲和性可以由亲和性的范围来指示,例如 10^6 到 10^{10}M^{-1} ,优选为 10^7 到 10^{10}M^{-1} ,更优选为 10^8 到 10^{10}M^{-1} 。“不表现出显著的交叉反应性”的抗体是指不与不需要的实体(例如一种不需要的蛋白实体)发生明显的结合的抗体。例如,一种特异性结合A β 的抗体将与A β 有明显的结合,但是不与非A β 的蛋白或肽(例如在斑中包含的非A β 的蛋白或肽)发生显著的反应。例如特异性针对优选的表位的抗体,不与同样的蛋白或肽上远处的表位发生显著的交叉反应。特异性结合可以使用任何本领域已知的测定这样结合的方法来测定。优选情况下,使用Scatchard分析和/或竞争性结合分析来测定特异性的结合。

[0043] 结合片段通过重组DNA技术,或通过完整的免疫球蛋白的酶法或化学水解来生产。结合片段包括Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab_c、Fv、单链和单链抗体。除了“双特异性的”或“双功能的”免疫球蛋白或抗体之外,免疫球蛋白或抗体被理解为每个结合位点都是相同的。“双特异性的”或“双功能的”抗体是一个人工的杂合抗体,具有两个不同的重链/轻链对和两个不同的结合位点。双特异性的抗体可以通过多种方法来生产,包括杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见例如Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79 : 315-321(1990);Kostelny等, J. Immunol. 148 :1547-1553(1992)。

[0044] 术语“人源化免疫球蛋白”或“人源化抗体”是指包括了至少一个人源化免疫球蛋白或抗体链(即至少一条人源化的轻链或重链)的免疫球蛋白或抗体。术语“人源化免疫球蛋白链”或“人源化抗体链”(即“人源化的免疫球蛋白轻链”或“人源化的免疫球蛋白重链”)是指免疫球蛋白或抗体链(即分别为轻链或重链),它具有可变区,包括了基本上来自人的免疫球蛋白或抗体的可变框架区和基本上来自非人类的免疫球蛋白或抗体的互补决定区(CDRs)(例如至少一个CDR,优选为两个CDRs,更优选为三个CDRs),还包括恒定区(例如在轻链的情况下至少一个恒定区或其部分,而在重链的情况下优选为三个恒定区)。术语“人源化可变区”(例如“人源化轻链可变区”或“人源化重链可变区”)是指一种可变区,它包括了基本上来自人的免疫球蛋白或抗体的可变框架区和基本上来自非人类的免疫球蛋白或抗体的互补决定区(CDRs)。

[0045] 词组“基本上来自人的免疫球蛋白或抗体”或“基本上人的”是指,当为了比较的目的与人类的免疫球蛋白或抗体氨基酸序列进行比对时,该区域与人类的框架或恒定区序列享有至少80-90%,90-95%,或95-99%的同一性(即局部序列同一性),其中允许例如保守取代、共有序列取代、种系取代、回复突变等。保守取代、共有序列取代、种系取代、回复突变等的引入通常被称为人源化抗体或链的“最适化”。词组“基本上来自非人类的免疫球蛋

白或抗体”或“基本上非人的”是指一种免疫球蛋白或抗体序列与一种非人类的生物体,例如非人类的哺乳动物的免疫球蛋白或抗体序列具有至少 80-95%,优选至少 90-95%,更优选为 96%、97%、98%或 99%的同一性。

[0046] 因此,人源化免疫球蛋白或抗体、或人源化免疫球蛋白或抗体链的所有区域或残基,可能除了 CDRs 之外,都基本上与一个或多个天然的人类免疫球蛋白序列的相应区域或残基相同。术语“相应区域”或“相应残基”是指,当为了比较的目的将两个序列进行最适化比对时,第二个氨基酸或核苷酸序列上的区域或残基与第一个氨基酸或核苷酸序列上的区域或残基占据同样的(即等同的)位置。

[0047] 术语“显著的同一性”是指两个多肽序列,当通过例如 GAP 或 BESTFIT 程序使用默认的间隙量进行最适比对时,享有至少 50-60%的序列同一性,优选至少 60-70%的序列同一性,更优选至少 70-80%的序列同一性,更优选至少 80-90%的序列同一性,更优选至少 90-95%的序列同一性,更优选至少 95%或以上的序列同一性(例如 99%或以上的序列同一性)。术语“基本上同一性”是指两个多肽序列,当通过例如 GAP 或 BESTFIT 程序使用默认的间隙量进行最适比对时,享有至少 80-90%的序列同一性,优选至少 90-95%的序列同一性,更优选至少 95%或以上的序列同一性(例如 99%或以上的序列同一性)。为了进行序列比较,一般来说以一个序列作为参比序列,测试序列与其相比较。在使用序列比较算法时,测试和参比序列被输入计算机,然后如果需要就设定子序列座标,再设定序列算法程序参数。然后序列比较算法基于设定的程序参数,计算出测试序列相对于参比序列的序列同一性百分数。

[0048] 用于比较的序列的最适比对可以使用 Smith & Waterman 的局部同源性算法 Adv. Appl. Math. 2 :482(1981)、Needleman & Wunsch 的同源比对算法 J. Mol. Biol. 48 :443(1970)、Pearson & Lipman 的相似性搜索方法 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :2444(1988)、对这些算法的计算机化执行(威斯康星遗传学软件包中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)、或通过肉眼检查(参见 Ausubel 等《现代分子生物学方法(Current Protocols in Molecular Biology)》)来进行。一个适合于确定序列同一性和序列相似性百分数的算法的例子是 BLAST 算法,在 Altschul 等, J. Mol. Biol. 215 :403(1990) 中有描述。进行 BLAST 分析的软件通过国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)对公众开放(公众可以通过国立卫生研究院 NCBI 英特网服务器进入)。一般来说,可以使用缺省的程序参数进行序列比较,尽管也可以使用定制的参数。对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用的缺省参数为词长度(W)为 3,预期数值(E)为 10,以及 BLOSUM62 记分矩阵(参见 Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :10915(1989))。

[0049] 在优选情况下,不一样的残基位置由于保守的氨基酸取代而有所不同。为了将氨基酸取代分类为保守的或非保守的,氨基酸被分为如下的组:第一组(疏水侧链):亮氨酸、甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸;第二组(中性亲水侧链):半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸;第三组(酸性侧链):天冬氨酸、谷氨酸;第四组(碱性侧链):天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸、精氨酸;第五组(影响链取向的残基):甘氨酸、脯氨酸;以及第六组(芳香族侧链):色氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸。保守取代涉及同一组中氨基酸之间的取代。非保守的取代包括一组中的成员与另一组中的成员之间的替换。

[0050] 优选情况下,人源化免疫球蛋白或抗体结合抗原的亲合性为 3、4 或 5 倍于相应的非人源化抗体的亲合性。例如,如果非人源化抗体的结合亲合性是 10^9M^{-1} ,人源化抗体的结合亲合性将至少为 $3 \times 10^9\text{M}^{-1}$ 、 $4 \times 10^9\text{M}^{-1}$ 或 $5 \times 10^9\text{M}^{-1}$ 。在描述免疫球蛋白或抗体链的结合特性时,可以基于链“指导抗原(例如 $\text{A}\beta$)结合”的能力来描述它。一条链,当它赋予完整的免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)特异性结合的性质或结合亲合性时,就被称为“指导抗原结合”。如果突变(例如回复突变)影响(例如减少)了含有该链的完整的免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)的结合亲合性,达到与含有缺少该突变的等同链的抗体(或其抗原结合片段)的结合亲合性相比差别至少一个数量级的时候,该突变被称为基本上影响了重链或轻链指导抗原结合的能力。如果突变对含有该链的完整的免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)的结合亲合性的影响(例如减少)与含有缺少该突变的等同链的抗体(或其抗原结合片段)的结合亲合性相比只差 2 倍、3 倍或 4 倍时,该突变“没有基本上影响(例如减少)该链指导抗原结合的能力”。

[0051] 术语“嵌合的免疫球蛋白”或抗体是指免疫球蛋白或抗体,其可变区来自于第一个物种而恒定区来自第二个物种。嵌合的免疫球蛋白或抗体可以通过例如遗传工程的方法,从属于不同物种的免疫球蛋白基因区段构建而成。术语“人源化免疫球蛋白”或“人源化抗体”并不包括嵌合的免疫球蛋白或抗体,如下文所定义的那样。尽管人源化的免疫球蛋白或抗体在它们的结构上是嵌合的(即含有来自一种以上蛋白的区域),但它们包括了在此处定义的嵌合的免疫球蛋白或抗体中没有发现的其它特点(即可变区含有供体 CDR 残基和受体的框架残基)。

[0052] “抗原”是抗体能够与其特异性结合的实体(例如蛋白实体或肽)。

[0053] 术语“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上的位点,免疫球蛋白或抗体(或其抗原结合片段)能够特异性与它相结合。表位可以由相邻的氨基酸或不相邻的氨基酸通过蛋白的三级折叠并置起来而形成。由相邻的氨基酸形成的表位当暴露到变性溶剂时一般能够保持,而通过三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理时通常会失去。典型的表位在独特的空间构象中包括至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括例如 X-射线晶体衍射和二维核磁共振。参见例如 G. E. Morris 主编的《分子生物学方法 (Methods in Molecular Biology)》第 66 卷中的“表位作图方案 (Epitope Mapping Protocols)”(1996 年)。

[0054] 识别同样表位的抗体可以在简单的免疫分析中被鉴定,该分析可以显示一个抗体阻断另一个抗体与靶抗原结合的能力,即竞争性结合分析。竞争性结合可以被一个分析所确定,在该分析中被测试的免疫球蛋白抑制了参比抗体与共同抗原例如 $\text{A}\beta$ 的特异性结合。已知有许多种类的竞争性结合分析,例如:固相的直接或间接放射免疫分析(RIA)、固相的直接或间接酶免疫分析(EIA)、三明治竞争分析(参见 Stahli 等, Methods in Enzymology 9:242(1983))、固相的直接生物素-亲和素 EIA(参见 Kirkland 等, J. Immunol. 137:3614(1986))、固相的直接标记分析、固相的直接标记三明治分析(参见 Harlow 和 Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press(1988))、使用 I-125 标记的固相的直接标记 RIA(参见 Morel 等, Mol. Immunol. 25(1):7(1988))、固相的直接生物素-亲和素 EIA(Cheung 等, Virology 176:546(1990))和直接的标记 RIA(Moldenhauer 等, Scand. J. Immunol. 32:77(1990))。一般来说,这样的分析包括使用

与固相表面结合的纯化的抗原、或带有未标记的测试免疫球蛋白和标记的参比免疫球蛋白中任一种的细胞。竞争性抑制通过确定在存在测试免疫球蛋白的情况下与固相表面或细胞结合的标记的量来测量。通常测试的免疫球蛋白是过量的。一般来说,当竞争性抗体过量时,它将抑制参比抗体与共同抗原的特异性结合达到至少 50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或以上。

[0055] 表位也被免疫细胞例如 B 细胞和 / 或 T 细胞所识别。表位的细胞识别可以通过体外分析来确定,该分析测定抗原依赖性的增殖,正如通过 ^3H - 胸腺嘧啶的掺入、通过细胞因子的分泌、通过抗体的分泌、通过抗原依赖性的杀死 (细胞毒性 T 淋巴细胞分析) 来确定。

[0056] 示例的表位或抗原决定簇可以在人类淀粉样前体蛋白 (APP) 中发现,但是在优选情况下在 APP 的 A β 肽中发现。APP 存在多种同工型,例如 APP⁶⁹⁵、APP⁷⁵¹ 和 APP⁷⁷⁰。APP 中的氨基酸是按照 APP⁷⁷⁰ 同工型的序列 (例如参见 GenBank 登录号 P05067) 来指派号码。A β (在本文中也称为 β 淀粉样肽和 A- β) 肽是一个大约 4-kDa 的含有 39-43 个氨基酸的 APP 内部片段 (A β 39、A β 40、A β 41、A β 42 和 A β 43)。例如 A β 40 由 APP 的 672-711 位残基组成,而 A β 42 由 APP 的 673-713 位残基组成。作为 APP 被不同的分泌酶进行体内或原位蛋白水解加工的结果,发现 A β 有两种形式,短的形式长度为 40 个氨基酸,而长的形式长度为 42-43 个氨基酸。正如在此处描述的那样,优选的表位或抗原决定簇位于 A β 肽的 N- 末端内,并包括了 A β 的 1-10 位氨基酸内的残基,优选为来自 A β 42 的 1-3、1-4、1-5、1-6、1-7 或 3-7 位残基。此外优选的表位或抗原决定簇包括 A β 的 2-4、5、6、7 或 8 位残基, A β 的 3-5、6、7、8 或 9 位残基,或 A β 42 的 4-7、8、9 或 10 位残基。当说抗体结合到特定的残基例如 A β 的 3-7 位残基中的表位时,其意思是指该抗体与含有该特定残基 (即,在这个例子中是 A β 的 3-7 位残基) 的多肽特异性结合。这样的抗体不必需与 A β 的 3-7 位残基中的每个残基接触。A β 的 3-7 位残基中的每个单氨基酸取代或缺失也不必然显著地影响结合亲和性。

[0057] 术语“生成淀粉样疾病”包括任何与不溶性的淀粉样纤维的形成或沉积有关的 (或由其引起的) 疾病。示例的生成淀粉样疾病包括但不限于全身性淀粉样变性病、阿茨海默氏病、成熟期发作的糖尿病、帕金森氏症、Huntington 氏病、额骨 - 颞部痴呆症以及与朊病毒相关的传染性海绵状组织脑病 (分别为人类的 kuru 和 Creutzfeldt-Jacob 病以及羊和牛中的瘙痒病和疯牛病)。不同的生成淀粉样疾病是根据沉积的纤维的多肽组分的本质来定义或表征的。例如,在患有阿茨海默氏病的对象或病人中, β - 淀粉样蛋白 (例如野生型、变体或截短的 β - 淀粉样蛋白) 是淀粉样沉积的特征性多肽组分。因此,阿茨海默氏病是“以 A β 的沉积为特征的疾病”或“与 A β 的沉积有关的疾病”的例子,该沉积发生在例如对象或病人的脑中。术语“ β - 淀粉样蛋白”、“ β - 淀粉样肽”、“ β - 淀粉体”、“A β ”和“A β 肽”在此可以互换使用。

[0058] “免疫原性试剂”或“免疫原”,在任选与佐剂结合起来给哺乳动物施用,能够诱导针对其自身的免疫反应。

[0059] 此处使用的术语“治疗”,被定义为给患有疾病、具有疾病的症状或者倾向于患有疾病的病人施用或给药一种治疗剂、或者给从病人分离的组织或细胞系施用或给药一种治疗剂,目的在于治疗、治愈、缓解、减轻、改变、医治、改善、提高或影响疾病、疾病的症状或患病的倾向性。

[0060] 术语“有效量”或“有效剂量”被定义为足够获得或至少部分获得预期疗效的量。术语“治疗上有效剂量”被定义为在已经患病的病人中足够治愈或至少部分阻止该病及其并发症的量。对于这种用途有效的量将依赖于感染的严重程度和病人自身免疫系统的整体状态。

[0061] 术语“病人”包括接受预防或治疗的人类和其它哺乳动物对象。

[0062] “溶解的”或“解离的”A β 是指非聚集的或没有聚集的 A β 多肽,包括单体溶解的以及寡聚体溶解的 A β 多肽(例如溶解的 A β 二聚体、三聚体等)。“不溶性的”A β 是指聚集的 A β 多肽,例如通过非共价键集合在一起的 A β 。据信 A β (例如 A β 42)的聚集至少在部分上是由于在肽的 C-端(APP 的跨膜结构域的一部分)存在疏水性残基。溶解的 A β 可以在体内的生物体液中发现,例如脑脊液和/或血清。此外,溶解的 A β 可以通过使用超声在纯 DMSO 中溶解冷冻干燥的肽而制备。得到的溶液被离心(例如在 4°C、14000xg 离心 10 分钟)以除去任何不溶的颗粒物。

[0063] 术语“效应子功能”是指保留在抗体(例如 IgG 抗体)的 Fc 区中的活性,包括例如抗体与效应器分子如补体和/或 Fc 受体结合的能力,它可以控制抗体的几种免疫功能,例如效应细胞活性、裂解、补体介导的活性、抗体清除和抗体半衰期。

[0064] 术语“效应器分子”是指能够与抗体(例如 IgG 抗体)的 Fc 区结合的分子,包括但不限于补体蛋白或 Fc 受体。

[0065] 术语“效应细胞”是指能够结合到抗体(例如 IgG 抗体)的 Fc 部分的细胞,结合一般是通过在效应细胞表面上表达的 Fc 受体来进行的,所述效应细胞包括但不限于淋巴细胞,例如抗原呈递细胞和 T 细胞。

[0066] 术语“Fc 区”是指 IgG 抗体的 C-末端区,特别是该 IgG 抗体重链的 C-末端区。尽管 IgG 重链 Fc 区的边界可以轻微地变化,但 Fc 区一般被定义为跨度从 IgG 重链的大约 226 位的半胱氨酸残基到其羧基末端。

[0067] 术语“Kabat 编号”除非特别说明,被定义为使用 EU 索引在例如 IgG 重链抗体中的残基的编码,如同在 Kabat 等的文献中那样(免疫学目的蛋白的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)),专门在此引为参考。

[0068] 术语“Fc 受体”或“FcR”是指一种与抗体的 Fc 区结合的受体。典型的与抗体(例如 IgG 抗体)的 Fc 区结合的 Fc 受体包括但不限于 Fc γ RI、Fc γ RII 和 Fc γ RIII 亚类的受体,包括这些受体的等位变体和替代拼接形式。Fc 受体在下列文献中有综述:Ravetch 和 Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92(1991);Capel 等, Immunomethods 4:25-34(1994);以及 de Haas 等, J. Lab. Clin. Med. 126:330-41(1995)。

[0069] I、免疫和治疗剂

[0070] 本发明的免疫和治疗剂包含或组成为此处定义的免疫原或抗体、或它们的功能性片段或抗原结合片段。已知抗体的基本结构单位含有亚基的四聚体。每个四聚体由两个相同的多肽链对组成,每对有一条“轻链”(大约 25kDa)和一条“重链”(大约 50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括大约 100 到 110 或以上个氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。每条链的羧基末端部分定义了恒定区,主要负责效应子功能。

[0071] 轻链被分为 κ 和 λ 型,长度大约 230 个残基。重链被分为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ 型,

长度大约 450–600 个残基,并定义了抗体的同种型,分别为 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。重链和轻链都折叠成结构域。术语“结构域”是指蛋白,例如免疫球蛋白或抗体的球状区域。免疫球蛋白或抗体的结构域包括例如通过 β -折叠片层和链间二硫键被稳定化的 3 或 4 个肽环。例如,完整的轻链具有两个结构域 (V_L 和 C_L),而完整的重链具有四或五个结构域 (V_H 、 C_H1 、 C_H2 和 C_H3)。

[0072] 在轻链和重链中,可变区和恒定区通过大约 12 个或以上的氨基酸构成的“J”区连接,重链中也包括大约 10 个或以上的氨基酸构成的“D”区(参见《基本免疫学 (Fundamental Immunology)》(Paul, W. 主编,第二版, Raven Press, N. Y. (1989), 第七章,为所有目的以其全文引为参考)。

[0073] 每个轻链 / 重链对的可变区形成了抗体结合位点。因此,完整的抗体具有两个结合位点。除了在双功能或双特异性抗体中以外,这两个结合位点是相同的。链都表现出同样的基本结构,相对保守的框架区域 (FR) 被三个超变区,也称为互补决定区或 CDRs 连接起来。天然产生的或重组产生的链被表达时可以带有前导序列,它在产生成熟链的细胞加工过程中被除去。带有非天然产生的前导序列的成熟链也可以重组产生,以便例如增加特定的目的链的分泌或改变其加工。

[0074] 每对的两条成熟链的 CDRs 被框架区连成一排,能够结合特异的表位。从 N- 端到 C- 端,轻链和重链都含有 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 结构域。“FR4”在本技术领域内也被称为可变重链的 D/J 区和可变轻链的 J 区。每个结构域中氨基酸的排布与 Kabat 的定义一致(《免疫学目的蛋白的序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest)》National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 和 1991)。Chothia 等也提出了另一种结构的定义 (J. Mol. Biol. 196 :901 (1987) ;Nature 342 :878 (1989) 和 J. Mol. Biol. 186 :651 (1989)) (在 下文中总称为“Chothia 等”,为所有目的以其全文引为参考)。

[0075] A、A β 抗体

[0076] 本发明的治疗剂包括特异性结合至 A β 或其它淀粉样斑成分的抗体。优选的抗体是单克隆抗体。有些这样的抗体特异性结合至聚集形式的 A β 但不结合可溶形式的 A β 。有些则特异性结合可溶形式的但不结合聚集形式的。有些则聚集形式和可溶形式的都结合。优选的用于治疗方法中的抗体具有完整的恒定区或至少足够的恒定区以便与 Fc 受体相互作用。优选的抗体能够在斑中有效地刺激 Fc 介导的 A β 的吞噬作用。人的同种型 IgG1 是优选的,因为它在人的同种型中与吞噬细胞上(例如脑部滞留的巨噬细胞或小神经胶质细胞上)的 FcRI 受体的亲和性最高。人的 IgG1 等同于鼠的 IgG2a,因此后者适合于在阿茨海默氏病的动物(例如小鼠)模型中试验体内功效。双特异性的 Fab 片段也可以使用,其中抗体的一个臂对 A β 有特异性,而另一个臂对 Fc 受体有特异性。优选的抗体与 A β 结合的结合亲和性大于(或等于)大约 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、或 $10^{10}M^{-1}$ (包括这些值中间的亲和性)。

[0077] 单克隆抗体与 A β 中特定的表位结合,该表位可以是构象的或非构象的表位。抗体的预防和治疗效果可以使用实施例中描述的转基因动物模型步骤来测试。优选的单克隆抗体与 A β 的 1–10 位残基(天然 A β 的第一个 N 末端残基被指定为第 1 位)中的表位结合,更优选的情况下与 A β 的 3–7 位残基中的表位结合。在一些方法中,使用了对不同的表位具有结合特异性的多个单克隆抗体,例如,一种特异性针对 A β 的 3–7 位残基中的表位的抗体,可以与一种特异性针对 A β 的 3–7 位残基之外的表位的抗体共同给药。这样的抗体

可以按顺序给药或也可以同时给药。针对除了 A β 之外其它的淀粉样成分的抗体也可以使用（例如给药或共同给药）。

[0078] 抗体的表位特异性可以被测定，例如通过形成噬菌体展示文库，其中不同的成员显示出不同的 A β 子序列。然后对噬菌体展示文库进行筛选，选择出在测试条件下与抗体特异性结合的成员。一个序列家族被分离。一般来说，这样的家族含有共同的核心序列，在不同成员中侧翼序列长度有所不同。能够显示出与抗体特异性结合的最短的核心序列定义了被抗体结合的表位。也可以在竞争性分析中测试抗体的表位特异性，其中使用一种其表位特异性已经被确定的抗体。例如，与 12A11 抗体竞争结合 A β 的抗体，与 12A11 结合相同或相似的表位，即位于 A β 的 3-7 位残基中的表位。筛选具有表位特异性的抗体是对治疗效果的一种有用的预测。例如，一种被确定与 A β 的 1-7 位残基中的表位结合的抗体，按照本发明的方法学可能有效地预防和治疗阿茨海默氏病。

[0079] 特异性结合优选的 A β 区段而不与 A β 的其它区域结合的抗体，相对于与其它区域结合的单克隆抗体或针对完整 A β 的多克隆血清来说有许多优点。首先，对于同样质量的剂量来说，特异性结合优选区段的抗体剂量含有对有效清除淀粉样斑的抗体具有更高的摩尔剂量。第二，特异性结合优选区段的抗体能够诱导针对淀粉样沉积的清除反应，而不会诱导针对完整的 APP 多肽的清除反应，因此减少了潜在的副作用。

[0080] 1、非人类抗体的生产

[0081] 本发明的特征在于非人类的抗体，例如对本发明的优选的 A β 表位具有特异性的抗体。这样的抗体可以用于配制本发明的各种治疗组合物，或者在优选情况下，为生产人源化的或嵌合的抗体（在下文中有详细描述）提供互补决定区。非人类，例如鼠、豚鼠、灵长动物、兔或大鼠的单克隆抗体的生产，可以通过例如用 A β 免疫动物来实现。含有 A β 或 A β 的免疫原性片段或针对 A β 抗体的抗独特型抗体的较长的多肽也可以使用（参见 Harlow & Lane, 同上，为所有目的引为参考）。这样的免疫原可以从天然来源、通过肽的合成或重组表达来获得。任选地，如下所述，免疫原可以与载体蛋白融合或络合在一起给药。任选地，免疫原可以与佐剂一起给药。术语“佐剂”是指一种化合物，当与一种抗原结合在一起给药时能增强对该抗原的免疫反应，但是当单独给药时不产生针对该抗原的免疫反应。佐剂可以通过几种机制增强免疫反应，包括召集淋巴细胞、刺激 B 和 / 或 T 细胞以及刺激巨噬细胞。下面描述的几种类型的佐剂可以使用。对于免疫实验动物来说优选的是弗氏完全佐剂以及随后使用不完全佐剂。

[0082] 兔或豚鼠一般被用来制造多克隆抗体。示例的多克隆抗体的制备，例如对于被动保护来说，可以如下进行。用 100 μ g A β 1-42 加上 CFA/IFA 佐剂免疫 125 只非转基因小鼠，4-5 个月时使小鼠安乐死。从免疫的小鼠收集血液。将 IgG 与其它的血液成分分离。特异性针对免疫原的抗体可以通过亲和层析部分纯化。平均从每只小鼠可以获得大约 0.5-1 mg 对免疫原特异的抗体，总共得到 60-120mg。

[0083] 小鼠一般被用来制造单克隆抗体。针对一种片段的单克隆抗体的制备可以通过将片段或较长形式的 A β 注射到小鼠中，制备杂交瘤，筛选产生特异性结合 A β 的抗体的杂交瘤。任选地，也筛选结合 A β 的特定区域或所需片段而不与 A β 的其它非重叠的片段结合的抗体。后者的筛选可以通过测定抗体与一系列 A β 肽的缺失突变体的结合、然后确定哪个缺失突变体与抗体结合来实现。结合可以用例如 Western 杂交或 ELISA 来评估。显示出

与抗体特异性结合的最小的片段被定义为抗体的表位。此外,表位特异性可以通过竞争性分析来确定,其中测试抗体与参比抗体竞争与 A β 的结合。如果测试抗体和参比抗体竞争,则它们结合到同样的表位或足够接近的表位上,以至一个抗体的结合干扰了另一个抗体的结合。这种抗体优选的同种型是小鼠的同种型 IgG2a 或其它物种中等同的同种型。小鼠的同种型 IgG2a 等同于人的同种型 IgG1(例如人 IgG1)。

[0084] 2、嵌合的和人源化的抗体

[0085] 本发明的特征还在于对 β -淀粉样肽特异的嵌合和/或人源化的抗体(即嵌合的和/或人源化的免疫球蛋白)。嵌合的和/或人源化的抗体与为构建嵌合或人源化抗体提供起始材料的小鼠或其它非人类抗体具有同样的或相似的结合特异性和亲和性。

[0086] a、嵌合抗体的生产

[0087] 术语“嵌合抗体”是指一种抗体,它的轻链和重链基因一般是通过遗传工程的方法从属于不同物种的免疫球蛋白基因区段构建的。例如,来自小鼠单克隆抗体的可变区(V)基因区段可以与人的恒定区(C)区段,诸如 IgG1 和 IgG4 相连接。优选的是人的同种型 IgG1。因此典型的嵌合抗体是一种杂合蛋白,由来自小鼠抗体的 V 或抗原结合结构域和来自人抗体的 C 或效应器结构域组成。

[0088] b、人源化抗体的生产

[0089] 术语“人源化抗体”是指一种抗体,其中包括至少一条链,含有基本上来自人抗体链(称为受体免疫球蛋白或抗体)的可变区框架残基和基本上来自小鼠抗体(称为供体免疫球蛋白或抗体)的至少一个互补决定区。参见 Queen 等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033(1989),US5530101,US5585089,US5693761,US5693762, Selick 等,W090/07861,和 Winter,US5225539(在此为所有目的以其全文引为参考)。恒定区,如果存在,也基本上或完全来自人的免疫球蛋白。

[0090] 如果人的可变结构域框架与 CDRs 所源自的小鼠的可变区框架采用相同或相似的构象,将小鼠 CDRs 替代到人的可变结构域框架中很可能会使它们的正确空间取向得到保留。这可以通过从其框架序列与 CDRs 所源自的鼠的可变框架结构域表现出高度序列同一性的人抗体中获得人可变结构域来实现。重链和轻链可变框架区可以来自相同或不同的人抗体序列。人抗体序列可以是天然发生的人抗体的序列,也可以是几种人抗体的共有序列。参见 Kettleborough 等,Protein Engineering 4:773(1991);Kolbinger 等,Protein Engineering 6:971(1993) 和 Carter 等,W0 92/22653。

[0091] 在鉴定了鼠供体免疫球蛋白的互补决定区和适当的人受体免疫球蛋白后,下一步是确定如果有的话,这些成分中的哪个残基应该被取代以便最优化产生的人源化抗体的性质。一般来说,用鼠的氨基酸残基取代人的氨基酸残基应该被最小化,因为导入鼠的残基增加了抗体在人中引发人抗小鼠抗体(HAMA)反应的危险。可以使用本领域现有的测定免疫反应的方法来监测一个特定病人中或临床试验过程中的 HAMA 反应。可以在进行该治疗的开始和整个过程中对给药人源化抗体的病人进行免疫原性评估。HAMA 反应的测量可以通过例如在病人的血清样品中检测针对人源化治疗剂的抗体,使用本领域技术人员公知的方法,包括表面胞质团共振技术(BIACORE)和/或固相 ELISA 分析。

[0092] 基于对 CDR 构象和/或与抗原结合的可能的影响,从人的可变区框架残基中选择某些氨基酸进行取代。非天然的鼠 CDR 区和人可变框架区的并置排列可能导致非天然的构

象的限制,除非通过某些氨基酸残基的取代进行校正,否则这将导致结合亲和性的丧失。

[0093] 对用于取代的氨基酸残基的选择,部分是通过建立计算机模型来确定的。此处描述的计算机硬件和软件用于产生免疫球蛋白分子的三维图象。一般来说,分子模型的产生是从免疫球蛋白链或其结构域的解析结构开始的。将要制作模型的链与解析的三维结构的链或结构域进行氨基酸序列相似性比较,表现出最大的序列相似性的链或结构域被选作构建分子模型的出发点。享有至少 50% 序列同一性的链或结构域被选来制作模型,在优选情况下享有至少 60%、70%、80%、90% 或以上序列同一性的链或结构域被选来制作模型。被解析的起始结构可以被修饰,允许在被制作模型的免疫球蛋白链或结构域中的实际氨基酸与起始结构中的氨基酸之间存在差异。然后将修饰后的结构组装成一种复合的免疫球蛋白。最后,通过使能量最小化和保证所有的原子都彼此在适当的距离之内以及键长和键角处于化学上可接受的限度之内来改进模型。

[0094] 用于替换的氨基酸的选择也可以部分地通过检验在特定位置的氨基酸的特征,或通过经验观察对特定氨基酸的取代或突变的影响来确定。例如,当在鼠的可变区框架残基和选择的人可变区框架残基之间有氨基酸不同时,一般来说人框架氨基酸应该可以用来自小鼠抗体的等同的框架氨基酸替换,只要有理由预计该氨基酸:

[0095] (1) 直接非共价地结合抗原,

[0096] (2) 临近 CDR 区,

[0097] (3) 或者与 CDR 区相互作用(例如通过计算机模型确定是位于距 CDR 区约 3- 6Å 的范围之内),或

[0098] (4) 参与了 VL-VH 界面。

[0099] “直接非共价地结合抗原”的残基包括位于框架区的氨基酸,这些氨基酸根据已建立的化学力例如氢键、范德华力、疏水相互作用等很可能直接与抗原上的氨基酸相互作用。

[0100] CDR 和框架区如 Kabat 等或 Chothia 等(同上)所定义的那样。当如 Kabat 等(同上)所定义的框架残基构成了如 Chothia 等(同上)所定义的结构环残基时,在小鼠抗体中存在的氨基酸可以被选择用来替换到人源化抗体中。“临近 CDR 区”的残基包括的氨基酸残基在位置上直接临近人源化免疫球蛋白链一级序列中的一个或多个 CDRs,例如位置上直接临近由 Kabat 所定义的 CDR,或由 Chothia 所定义的 CDR(参见例如 Chothia 和 Lesk JMB 196 :901(1987))。这些氨基酸特别可能与 CDRs 中的氨基酸相互作用,并且如果从受体中被选择出来,特别可能使供体 CDRs 变形并减少亲和性。此外,相邻氨基酸可直接与抗原相互作用(Amit 等,Science,233 :747(1986),在此引作参考),并且从供体中选择这些氨基酸可以理想地保持所有抗原接触,以在原始抗体中提供亲和性。

[0101] “或者与 CDR 区相互作用”的残基包括那些通过二级结构分析 确定的在空间取向上足够影响 CDR 区的残基。在一个实施方案中,“或者与 CDR 区相互作用”的残基通过分析供体免疫球蛋白的三维模型(例如计算机生成的模型)而被鉴定。三维模型,一般是最初的供体抗体的,显示出在 CDRs 外的某些氨基酸靠近 CDRs,并很可能通过氢键、范德华力、疏水相互作用等与 CDRs 中的氨基酸相互作用。在那些氨基酸位置,可以选择供体免疫球蛋白的氨基酸而不是受体免疫球蛋白的氨基酸。根据这个标准挑选的氨基酸一般带有与 CDRs 中的某原子距离在大约 3Å 之内的侧链原子,并必须含有能够通过已建立的化学力例如上面列出的那些,与 CDRs 的原子相互作用的原子。

[0102] 在原子可以形成氢键的情况下, $3\text{\AA}$ 是在它们的核之间测量的,但是对于不形成键的原子, $3\text{\AA}$ 是在它们的范德华表面之间测量的。因此,在后一种情况下,对于被考虑能够相互作用的原子来说,核必须在大约 $6\text{\AA}$ 之内 ($3\text{\AA}$ 加上平均范德华半径之和)。在许多情况下,核将分开 4 或 5 到 $6\text{\AA}$ 。在确定氨基酸是否能够与 CDRs 相互作用时,优选不将重链 CDR2 的最后 8 个氨基酸考虑为 CDRs 的一部分,这是因为从结构的观点来说,这 8 个氨基酸在行为上更象框架的一部分。

[0103] 能够与 CDRs 中的氨基酸相互作用的氨基酸也可以通过其它方法鉴定。每个框架氨基酸的溶剂可接近面积以两种方式进行计算:(1) 在完整抗体中,以及 (2) 在由除去了其 CDRs 的抗体组成的假定分子中。在大约 10 平方埃或以上的这些数值之间的显著区别显示了框架氨基酸对溶剂的进入至少部分被 CDRs 阻断,因此氨基酸正与 CDRs 相接触。氨基酸的溶剂可接近表面面积可以在抗体的三维模型的基础上,使用本领域已知的算法(例如 Connolly, J. Appl. Cryst. 16 :548(1983) 以及 Lee 和 Richards, J. Mol. Biol. 55 :379(1971),两篇文献在此都引为参考)进行计算。通过影响另一个与 CDRs 接触的框架氨基酸的构象,偶尔框架氨基酸也可以间接地与 CDRs 相互作用。

[0104] 框架中若干位置处的氨基酸已知对在许多抗体中确定 CDR 构象(例如,能够与 CDRs 反应)是重要的(Chothia 和 Lesk,同上,Chothia 等同上以及 Tramontano 等 J. Mol. Biol. 215 :175(1990),所有文献在此引作参考)。这些作者通过分析若干已知抗体的结构鉴定出对 CDR 构型重要的保守性框架残基。基于 CDRs 的构象,分析的抗体落入有限数目的结构或“经典”类型。经典类型成员内的保守性框架残基称为“经典”残基。经典残基包括轻链的第 2,25,29,30,33,48,64,71,90,94 和 95 位残基以及重链的第 24,26,29,34,54,55,71 和 94 位残基。根据 Martin 和 Thornton(1996) J. Mol. Biol. 263 :800 中的方法学,其他残基(例如,确定 CDR 结构的残基)也可被鉴定。值得注意的是,已知轻链的 2、48、64 和 71 位氨基酸和重链的 26-30、71 和 94 位氨基酸(根据 Kabat 编号)能够与许多抗体中的 CDRs 相互作用。在轻链的 35 位和重链的 93 和 103 位的氨基酸也可能与 CDRs 相互作用。根据 Foote 和 Winter(1992) J. Mol. Biol. 224 :487 中的方法学,可能影响 CDRs 构象的其他残基也被鉴定。这些残基称为“微调”残基,并且是靠近 CDRs 位置下方的框架区(即 CDRs 下方形成“平台”)中的那些残基。在所有这些编号的位置上,(当两者不同时)在人源化免疫球蛋白中优先选择供体的氨基酸而不是受体的氨基酸。在另一方面,某些能够与 CDR 区相互作用的残基,例如轻链的前 5 个氨基酸,有时可以从受体免疫球蛋白中选择而不丧失在人源化免疫球蛋白中的亲和性。

[0105] “参与 VL-VH 界面”的残基或“装配残基”包括那些在 VL 和 VH 之间界面上的残基,如被例如 Novotny 和 Haber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82 :4592-66(1985) 或 Chothia 等,同上所定义的那样。一般来说,稀有的装配残基应该被保留在人源化抗体中,如果它们与人框架中的残基不同的话。

[0106] 一般来说,满足上述标准的一个或多个氨基酸被取代。在某些实施方案中,所有或大多数满足上述标准的氨基酸被取代。偶尔,关于一个特定的氨基酸是否符合上述的标准有一些模糊,并且生产两种变体免疫球蛋白,一种有特定的取代,另一种没有。这样产生的两种变体免疫球蛋白可以在任何本文描述的分析中测试所需的活性,然后选择优选的免疫球蛋白。

[0107] 通常,人源化抗体中的 CDR 区与供体抗体的对应 CDR 区基本上相同,以及更通常完全相同。然而,在某些实施方案中,理想的是修饰一个或多个 CDR 区,以修饰抗体的抗原结合特异性和/或减少抗体的免疫原性。一般而言,改变 CDR 的一个或多个残基以修饰结合,从而取得更有利的结合打开速率,更有利的结合关闭速率,或两者,以致实现理想的结合常数。利用该策略,可获得具有超高结合亲和性,例如, 10^{10}M^{-1} 或更高的抗体。简而言之,供体 CDR 序列称作基础序列,从中一个或多个残基被改变。在此所述的亲和性成熟技术可用于改变 CDR 区,接着筛选所得结合分子在结合中所需的变化。该方法还可用于改变供体 CDR,通常为小鼠 CDR,至较小免疫原性,以致潜在的人抗小鼠抗体 (HAMA) 反应被最小化或避免。因此,由于 CDR 被改变,结合亲和性以及免疫原性的变化得以监控和评价,从而实现抗体对最好组合的结合和低免疫原性的优化(参见,例如, U. S. 专利 No. 6,656,467 和 U. S. 专利公开 US20020164326A1)。

[0108] 在另一方法中,通过以人对应物系统性替代各供体 CDRs,分析抗体的 CDR 区,以确定各单个 CDR 对抗体结合和/或免疫原性的贡献。然后,对所得组的人源化抗体的各个 CDR 的抗原亲和性和潜在的免疫原性进行评价。以此,候选结合分子的两个临床重要属性,即抗原结合和低免疫原性被确定。如果针对相应鼠或 CDR-嫁接(人源化)形式的抗体的患者血清可获得,则筛选代表系统性人 CDR 交换的整个组的抗体,以确定针对各个供体 CDR 的患者抗独特型反应(技术细节参见,例如, Iwashii 等 *Mol. Immunol.* 36:1079-91(1999))。这样一种方法允许从非必需供体 CDRs 中鉴定必需供体 CDR 区。然后,非必需供体 CDR 区域可与人对对应物 CDR 交换。如果必需 CDR 区不可被交换,没有不可接受的功能丧失,例如通过定点突变,鉴定 CDR 的特异性确定的残基(SDRs)。以此方式,CDR 然后可被重新改造成仅保持 SDRs,并且是人和/或在整个 CDR 的剩余氨基酸位置处是最小免疫原性的。这样一种方法,如果仅有部分供体 CDR 被嫁接,也称作小型 CDR-嫁接的(上述技术的细节参见,例如, Tamura 等 *J. of Immunology* 164(3):1432-41(2000); Gonzales 等 *Mol. Immunol.* 40:337-349(2003); Kashmiri 等 *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 38:3-16(2001); 和 De Pascalis 等 *J. of Immunology* 169(6):3076-84(2002))。

[0109] 而且,有时可能替换 CDR 残基的一个或多个保守性氨基酸而一点没有影响所得人源化免疫球蛋白的结合亲和性。保守性替换是预期的组合,诸如 gly, ala; val, ile, leu; asp, glu; asn, gln; ser, thr; lys, arg; 和 phe, tyr。

[0110] 其它的用于取代的候选者是针对人免疫球蛋白来说在该位置是不寻常的或“稀有”的受体人框架氨基酸。这些氨基酸可以用来自小鼠供体抗体的等同位置或来自更典型的人免疫球蛋白的等同位置的氨基酸来取代。例如,当受体人免疫球蛋白框架区的氨基酸对于该位置来说是稀有的,而供体免疫球蛋白中相应的氨基酸对于人免疫球蛋白序列的那个位置来说是常见的,或者当受体免疫球蛋白中的氨基酸对于该位置来说是稀有的,而供体免疫球蛋白中相应的氨基酸相对于其它的人类序列来说也是稀有的时候,可以进行取代。当基于对 CDR 构象的贡献选择回复突变的残基时,残基对受体人框架序列是否是稀有的也应被考虑。例如,如果回复突变导致替换对受体人框架序列是稀有的残基,测试带有或不带有稀有残基的人源化抗体的活性。如果回复突变对活性不是必需的,则可被消除以减少对免疫原性的担忧。例如,下列残基的回复突变可导入受体人框架序列中稀有的残基; uk = v2(2.0%), L3(0.4%), T7(1.8%), Q18(0.2%), L83(1.2%), I85(2.9%),

A100(0.3%) 和 L106(1.1%); 和 $vh = T3(2.0\%), K5(1.8\%), I11(0.2\%), S23(1.5\%), F24(1.5\%), S41(2.3\%), K71(2.4\%), R75(1.4\%), I82(1.4\%), D83(2.2\%)$ 和 L109(0.8%)。这些标准帮助确保在人类框架中的非典型氨基酸不会破坏抗体的结构。此外,通过用来自供体抗体的对人类抗体来说是典型的氨基酸来代替不寻常的人类受体氨基酸,可以使人源化抗体具有更小的免疫原性。

[0111] 此处使用的术语“稀有的”表示一种氨基酸,在代表性的序列样品中出现在那个位置上的概率少于大约 20%、优选少于大约 10%、更优选小于大约 5%、甚至更优选小于大约 3%、甚至更优选小于大约 2% 和甚至更优选小于大约 1% 的序列,而此处使用的术语“常见的”表示一种氨基酸,在代表性的序列样品中出现在那个位置上的概率多于大约 25%、更经常是多于大约 50% 的序列。例如,当决定人受体序列中的氨基酸是否是“稀有的”或“常见的”时,通常只优选考虑人可变区序列,而当决定小鼠氨基酸是否是“稀有的”或“常见的”时,通常只优选考虑小鼠可变区序列。而且,所有的人轻链和重链可变区序列分别被分组成序列的“亚群”,亚群中的序列彼此之间特别同源,并且在某些关键位置上具有相同的氨基酸(Kabat 等,同上)。在决定一种人类受体序列中的氨基酸在人类序列中是“稀有的”还是“常见的”时,通常只优选考虑那些与受体序列在同样的亚群中的人类系列。

[0112] 其它的用于取代的候选者是根据 Chuthia 等,同上提出的另一种定义被鉴定成一部分 CDR 区的受体人框架氨基酸。其它的用于取代的候选者是根据 AbM 和 / 或接触定义被鉴定为一部分 CDR 区的受体人框架氨基酸。

[0113] 其它的用于取代的候选者是对应于稀有的或不寻常的供体框架残基的受体框架残基。稀有的或不寻常的供体框架残基是那些对于鼠抗体来说在该位置是稀有的或不寻常(如本文所定义)的残基。对于鼠抗体来说,亚群可以按照 Kabat 和经鉴定与共有序列不同的残基位置来确定。这些供体特异性的差别可以指出在鼠序列中能够增加活性的体细胞突变。被预计能影响结合的不寻常残基(例如,装配、经典和 / 或微调残基)被保留,但是被预计对于结合来说不重要的残基可以被替换。12A11 UK 序列内的稀有残基包括 I85(3.6%)。12A11 vh 序列内的稀有残基包括 T3(1.0%), I11(1.7%), L12(1.7%), S41(2.8%), D83(1.8%) 和 A85(1.8%)。

[0114] 其它的用于取代的候选者是受体框架区中存在的非种系残基。例如,当将一种受体抗体链(即与供体抗体链享有明显的序列同一性的人类抗体链)与一个种系抗体链(同样与供体链享有明显的序列同一性)比对时,受体链框架和种系链框架之间不匹配的残基可以用来自种系序列的相应残基取代。

[0115] 除了上面讨论的特异氨基酸取代之外,人源化免疫球蛋白的框架区通常是基本一致的,或者更经常的是与它们所来自的人类抗体的框架区一致。当然,框架区中的许多氨基酸对于抗体的特异性或亲和性几乎没有或完全没有直接的贡献。因此,许多单个的框架残基的保守取代是可以容忍的,它们不明显改变得到人源化免疫球蛋白的特异性或亲和性。因此,在一个实施方案中,人源化免疫球蛋白的可变框架区与人类的可变框架区序列或这些序列的共有序列享有至少 85% 的序列同一性。在另一个实施方案中,人源化免疫球蛋白的可变框架区与人类可变框架区序列或这些序列的共有序列享有至少 90%、优选为 95%、更优选为 96%、97%、98% 或 99% 的序列同一性。但是一般来说,这样的取代是不希望的。

[0116] 在举例的实施方案中,本发明的人源化抗体对抗原显示至少 10^7 , 10^8 , 10^9 , 或 10^{10}M^{-1} 的特异结合亲和性。在其他实施方案中,本发明的抗体可具有至少 10^{10} , 10^{11} , 或 10^{12}M^{-1} 的结合亲和性。人源化抗体与抗原的结合亲和性的上限通常在供体免疫球蛋白的结合亲和性的 3、4 或 5 倍的范围内。结合亲和性的下限通常也在供体免疫球蛋白的结合亲和性的 3、4 或 5 倍的范围内。此外,结合亲和性也可以与没有取代的人源化抗体(例如具有供体 CDRs 和受体 FRs,但是没有 FR 取代的抗体)的结合亲和性进行比较。在这种情况下,最优化的抗体(具有取代)的结合优选为至少比未取代的抗体的结合高 2 到 3 倍或 3 到 4 倍。为了进行比较,可以测定不同抗体的活性,例如通过 BIACORE(即使用非标记试剂的表面胞质团共振)或竞争性结合分析。

[0117] c、人源化 12A11 抗体的生产

[0118] 具体来说,本发明的一个优选实施方案的特征是一种针对 A β 的 N 末端的人源化抗体,用于本文描述的治疗和 / 或诊断方法学中。生产人源化抗体的一种特别优选的起始材料是 12A11。12A11 特异性针对 A β 的 N 末端,并已显示 (1) 对聚集的 A β 1-42 具有高亲和力, (2) 具有捕获可溶性 A β 的能力,以及 (3) 介导淀粉样斑的吞噬作用(例如,诱导吞噬作用)(参见实施例 I)。12A11 抗体的体内功效描述在实施例 II 中。编码 12A11 抗体重链和轻链可变区的 cDNA 的克隆和测序描述在实施例 III 中。

[0119] 通过对小鼠可变区氨基酸序列和已知的人抗体的序列的计算机比较鉴定出了合适的人受体抗体序列。重链和轻链的比较是分别进行的,但各个的原理是相同的。具体来说,其框架序列与鼠 VL 和 VH 框架区表现出高度序列同一性的人抗体可变区,通过利用 NCBI IgGBLAST(可以通过国立卫生研究院 NCBI 互联网服务器公开进入)以相应的鼠框架序列在 Kabat 数据库或 IgG 蛋白序列数据库中进行查询而鉴定。在一个实施方案中,与鼠供体序列,例如供体框架 (FR) 序列享有多于 50% 的序列同一性的受体序列被选择。在优选情况下,选择享有 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 或更高的序列同一性的受体抗体序列。

[0120] 12A11 的计算机比较发现 12A11 的轻链(小鼠亚群 II) 与人轻链的 κ II 亚型显示出最高的序列同一性,以及 12A11 的重链(小鼠亚群 Ib) 与人重链的 II 亚型显示出最高的序列同一性,其定义见 Kabat 等,同上。轻链和重链人框架区可来自这些亚型的人类抗体,或者来自这些亚型的共有序列。在第一人源化尝试中,轻链可变框架区衍生自人亚群 II 抗体。基于为实现高水平表达具有来自人类亚群 II 抗体的重链可变框架区的人源化抗体而设计的先前实验,已发现这种抗体的表达水平有时是低的。因此,基于 Saldanha 等 (1999) Mol Immunol. 36 :709-19 中所述的理由,选择来自人类亚群 III 抗体的框架区而非人类亚群 II。

[0121] 人亚群 II 抗体 K64(AIMS4)(登录号 BAC01733) 从在 12A11 的轻链可变区内具有显著序列同一性的 NCBI 非多余数据库中得以鉴定。人亚群 III 抗体 M72(登录号 AAA69734) 从在 12A11 的重链可变区内具有显著序列同一性的 NCBI 非多余数据库中得以鉴定(同样参见, Schroeder 和 Wang (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 872 :6146-6150)。

[0122] 替代的轻链受体序列包括,例如, PDB 登录号 1KFA(gi24158782), PDB 登录号 1KFA(gi24158784), EMBL 登录号 CAE75574.1(gi38522587), EMBL 登录号 CAE75575.1(gi38522590), EMBL 登录号 CAE84952.1(gi39838891), DJB 登录

号 BAC01734.1(gi21669419), DJB 登录号 BAC01730.1(gi21669411), PIR 登录号 S40312(gi481978), EMBL 登录号 CAA51090.1(gi3980118), GenBank 登录号 AAH63599.1(gi39794308), PIR 登录号 S22902(gi106540), PIR 登录号 S42611(gi631215), EMBL 登录号 CAA38072.1(gi433890), GenBank 登录号 AAD00856.1(gi4100384), EMBL 登录号 CAA39072.1(gi34000), PIR 登录号 S23230(gi284256), DBJ 登录号 BAC01599.1(gi21669149), DBJ 登录号 BAC01729.1(gi21669409), DBJ 登录号 BAC01562.1(gi21669075), EMBL 登录号 CAA85590.1(gi587338), GenBank 登录号 AAQ99243.1(gi37694665), GenBank 登录号 AAK94811.1(gi18025604), EMBL 登录号 CAB51297.1(gi5578794), DBJ 登录号 BAC01740.1(gi21669431), 和 DBJ 登录号 BAC01733.1(gi21669417)。替代的重链受体序列包括, 例如, GenBank 登录号 AAB35009.1(gi1041885), DBJ 登录号 BAC01904.1(gi21669789), GenBank 登录号 AAD53816.1(gi5834100), GenBank 登录号 AAS86081.1(gi46254223), DBJ 登录号 BAC01462.1(gi21668870), GenBank 登录号 AAC18191.1(gi3170773), DBJ 登录号 BAC02266.1(gi21670513), GenBank 登录号 AAD56254.1(gi5921589), GenBank 登录号 AAD53807.1(gi5834082), DBJ 登录号 BAC02260.1(gi21670501), GenBank 登录号 AAC18166.1(gi3170723), EMBL 登录号 CAA49495.1(gi33085), PIR 登录号 S31513(gi345903), GenBank 登录号 AAS86079.1(gi46254219), DBJ 登录号 BAC01917.1(gi21669815), DBJ 登录号 BAC01912.1(gi21669805), GenBank 登录号 AAC18283.1(gi3170961), DBJ 登录号 BAC01903(gi21669787), DBJ 登录号 BAC01887.1(gi21669755), DBJ 登录号 BAC02259.1(gi21370499), DBJ 登录号 BAC01913.1(gi21807), DBJ 登录号 BAC01910.1(gi21669801), DJB 登录号 BAC02267.1(gi21670515), GenBank 登录号 AAC18306.1(gi3171011), GenBank 登录号 AAD53817.1(gi5834102), PIR 登录号 E36005(gi106423), EMBL CAB37129.1(gi4456494) 和 GenBankAAA68892.1(gi186190)。

[0123] 在举例的实施方案中, 本发明的人源化抗体包括来自上文所列的受体序列的 12A11 CDRs 和 FRs。在此所述的对 CDR 构象和 / 或活性重要的框架区内的残基被选择回复突变 (如果供体和受体序列之间存在差异)。

[0124] 下一步选择用于取代的残基, 如下所述。当在 12A11 可变框架区和等同的人可变框架区之间存在氨基酸不同时, 人可变框架区通常应该被等同的小鼠氨基酸取代, 只要有理由预计该氨基酸:

[0125] (1) 直接非共价地结合抗原,

[0126] (2) 临近 CDR 区, 是根据 Chothia 等, 同上提出的替代定义下的一部分 CDR 区, 或相反与 CDR 区相互作用 (例如位于距 CDR 区大约 3Å 的范围之内), 或

[0127] (3) 参与了 VL-VH 界面。

[0128] 12A11 抗体重链和轻链可变区的结构分析, 以及 12A11 抗体的人源化描述在实施例 V 中。简而言之, 对解析的鼠抗体轻链结构 1KTR 以及重链结构 1JRH 和 1ETZ 的三维模型进行研究。为鉴定对 CDR 构象重要的残基 (例如, 微调残基) 而研究的替代三维模型包括, 对轻链而言, PDB 登录号 2JEL(gi3212688), PDB 登录号 1TET(gi494639), PDB 登录号 IJP5(gi16975307), PDB 登录号 1CBV(gi493917), PDB 登录号 2PCP(gi4388943), PDB 登录号

1I9I(gi2050118), PDB 登录号 1CLZ(gi1827926), PDB 登录号 1FL6(gi17942615) 和 PDB 登录号 1KEL(gi1942968), 和对重链而言, PDB 1GGI(gi442938), PDB 登录号 1GGB(gi442934), PDB 登录号 1N5Y(gi28373913), PDB 登录号 2HMI(gi3891821), PDB 登录号 1FDL(gi229915), PDB 登录号 1KIP(gi1942788), PDB 登录号 1KIQ(gi1942791) 和 PDB 登录号 1VFA(gi576325)。

[0129] 在此描述的抗体的三维结构信息, 例如, 可从结构生物信息学蛋白数据库 (PDB) 研究实验室 (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics' Protein Data Bank (PDB)) 公开获得。PDB 经由万维网免费进入, 并描述在 Berman 等 (2000) *Nucleic Acids Research*, 28 :235 中。解析的三维结构的研究允许在 12A11 内鉴定 CDR- 相互作用残基。此外, 利用计算机建模软件, 可生成 12A11 VH 和 VL 的三维模型。简而言之, 基于重链和轻链最接近的解析鼠抗体结构生成三维模型。为此目的, 1KTR 可用作 12A11 轻链建模的模板, 而 1ETZ 和 1JRH 用作重链建模的模板。模型进一步被一系列能量最小化步骤而改进, 以减轻不利的原子接触, 和优化静电和范德华相互作用。基于这些解析的鼠结构和各自 12A11 链之间的相似性, 对轻链利用 2JEL ($2.5\text{\AA}$) 和 / 或 1TET ($2.3\text{\AA}$), 以及对重链利用 1GGI ($2.8\text{\AA}$) (或上述其他抗体), 进行其他三维分析和 / 或建模。

[0130] 12A11 结构的计算机模型可进一步用作起始点, 用于预测抗体的三维结构, 所述抗体含有在人框架结构中替换的 12A11 互补决定区。当其他氨基酸替换被引入时, 可构建代表结构的其他模型。

[0131] 总的说来, 取代满足上述标准的一个、大多数或所有的氨基酸是可以预期的。因此, 本发明的人源化抗体通常将在至少 1、2、3 或更多的选定位置用相应的 12A11 残基取代人轻链框架残基。人源化抗体通常也在至少 1、2、3 或更多的选定位置用相应的 12A11 残基取代人重链框架残基。

[0132] 但是, 关于特定的氨基酸是否符合上述的标准偶尔有一些模糊, 这时生产两种变体免疫球蛋白, 一种有特定的取代, 另一种没有。在用鼠的残基取代将在特定位点引入在人免疫球蛋白中稀有的残基的情况下, 可能希望测试在有或没有特定取代的情况下抗体的活性。如果有或没有取代时活性 (例如结合亲和性和 / 或结合特异性) 大约相同, 没有取代的抗体可能是优选的, 因为预计它将引发较少的 HAMA 反应, 如本文所描述。

[0133] 其它的用于取代的候选者是对于人免疫球蛋白来说在该位置是不寻常的受体人框架氨基酸。这些氨基酸可以用来自更典型的人免疫球蛋白的等同位置的氨基酸来取代。此外, 来自小鼠 12A11 中等同位置的氨基酸, 当它们在所述等同位置上对于人免疫球蛋白来说是典型的时, 可以被引入到人框架区中。

[0134] 其它的用于取代的候选者是框架区中存在的非种系残基。通过将 12A11 与已知的种系序列进行计算机比较, 可以鉴定出与重链或轻链具有最高度的序列同一性的种系序列。框架区和种系序列的比对将揭示出哪个残基可以被选择出来用相应的种系残基取代。在选定的轻链受体框架和这些种系序列之一之间不匹配的残基可以被选择出来用相应的种系残基取代。

[0135] 稀有小鼠残基的鉴定方法是将供体 VL 和 / 或 VH 序列与供体 VL 和 / 或 VH 序列所属的亚群 (根据 Kabat) 中的其它成员的序列进行比较, 并且鉴定出与共有序列不同的残基位置。这些供体特异性的区别可以指出能够增加活性的体细胞突变。靠近结合位点的不寻常或稀有残基可能与抗原接触, 使得保留小鼠的残基是希望的。但是, 如果不寻常的小鼠

残基对于结合来说是不重要的,优选使用相应的受体残基,因为小鼠残基可能在人源化抗体中产生免疫原性新表位。在供体序列中的不寻常残基在相应的受体序列中实际上是常见残基的情况下,优选的残基显然是受体残基。

[0136] 表 1A 总结 12A11VH 和 VL 区的序列分析。

[0137] 表 1. 12A11V 区序列概述

[0138]

链	VL	VH
小鼠亚群	II	Ib
人亚群	II	II
小鼠 vk 中的稀有氨基酸 (%频率)	I85 (3.6%)	I11 (1.7%)
Chothia 经典类型	L1: 类 4[16f] L2: 类 1[7] L3: 类 1[9]	H1: 类 3 [7] H2: 类 1[16] H3 ¹
最接近的小鼠 Mab 解析结构	1KTR ²	1ETZ ³ (2.6Å) 和 1JRH ⁴
与模型模板的同源性	94%	83% 和 86%
人框架序列	K64 (BAC01733) (87% FR, 67% 总和)	M72 (AAA69734) (61% FR, 45%总和)
供体备注	Hu k LC 亚群 II 与 12A11 来自相同经典结构组的 CDRs	HU HC 亚型 III 与 12A11 来自相同经典结构组的 CDRs
回复突变备注	无	A24F, F29L: H1 R71K: 经典, H2 V371: 装配 T28S, V48L, F67L, N73T, L78V: 微调
人框架的种系参照	A19 VL Vk2-28 mRNA: X63397.1 (GI:33774)	AAA69731.1 (GI:567123)

[0139] ¹ 没有经典类,但根据 Shirai 等 (1999)FEBS Lett. 455 :188-197 的规则可形成弯曲碱基 (Kinked base)。

[0140] ²Kaufmann 等 (2002)J Mol Biol. 318 :135-147.

[0141] ³Guddat 等 (2000)J Mol Biol. 302 :853-872.

[0142] ⁴Sogabe 等 (1997)J Mol Biol. 273 :882-897.

[0143] 阐述的种系序列可用于选择氨基酸替换。

[0144] 此处描述的抗体的三维结构信息是公众可以使用的,例如获自结构生物信息学研究联合实验室的蛋白数据库 (PDB)。PDB 是通过万维网可以免费进入的,并在 Berman 等 (2000)Nucleic Acids Research,p235-242 中有描述。此处引用的种系基因序列是公众可

以得到的,例如获自国家生物技术信息中心 (NCBI) 的 Igh、Ig κ 和 Ig λ 种系 V 基因采集序列库 (作为国立卫生研究院 (NIH) 的国家医学图书馆 (NLM) 的一个分部)。NCBI 的“Ig 种系基因”同源性搜索数据库由 IgG BLAST™ 提供。

[0145] 在示例性实施方案中,本发明的人源化抗体含有 (i) 包括含有鼠 12A11 VL CDRs 的可变结构域和人受体框架的轻链,框架带有 0,1,2,3,4,5,6,7,8,9 或更多个用相应的 12A11 残基取代的残基,和 (ii) 含有 12A11 VH CDRs 和人受体框架的重链,框架带有至少 1,2,3,4,5,6,7,8 或 9 或更多个用相应的 12A11 残基取代的残基,以及任选至少 1 个,优选 2 或 3 个用相应的人种系残基取代的残基。

[0146] 在另一举例的实施方案中,本发明的人源化抗体含有 (i) 轻链,其包括的可变区含有鼠 12A11 VL CDRs 和人受体框架,该框架具有至少 1,2,3,4,5,6,7,8,9,或更多个回复突变残基 (即以相应的 12A11 残基替代),其中回复突变发生在经典,装配和 / 或微调残基处,以及 (ii) 重链,其包括 12A11 VH CDRs 和人受体框架,该框架具有至少 1,2,3,4,5,6,7,8,9,或更多个回复突变残基,其中回复突变发生在经典,装配和 / 或微调残基处。在某些实施方案中,回复突变仅出现在装配和 / 或经典残基处,或主要发生在经典和 / 或装配残基处 (例如,供体和受体序列之间区分的微调残基中只有 1 或 2 个被回复突变)。

[0147] 在其他实施方案中,人源化抗体包括最少数目的可能的回复突变,同时保留与供体抗体 (或其嵌合形式) 可比的结合亲和性。为了获得这类形式,各种不同组合的回复突变可被消除,并测试所得抗体的功效 (例如,结合亲和性)。例如,微调残基处的回复突变 (例如,1,2,3,或 4 回复突变) 可被消除,或者微调和装配,微调和经典,或装配和经典残基的组合处回复突变可被消除。

[0148] 在另一实施方案中,本发明的人源化抗体具有本文描述的结构特点,并且还具有至少 1 个 (优选 2,3,4 个或所有的) 下面的活性: (1) 结合可溶性的 A β ; (2) 结合聚集的 A β 1-42 (例如如通过 ELISA 确定的那样); (3) 捕获可溶性 A β ; (4) 结合斑中的 A β (例如 AD 和 / 或 PDAPP 斑的染色); (5) 与嵌合的 12A11 (例如含有鼠可变区序列和人恒定区序列的 12A11) 相比与 A β 结合的结合亲和性低 2 到 3 倍以上; (6) 介导 A β 的吞噬作用 (例如在本文描述的离体吞噬作用分析中); 以及 (7) 通过血-脑屏障 (例如在本文描述的 PDAPP 动物模型中表现出短期的脑部定位)。

[0149] 在另一个优选实施方案中,本发明的人源化抗体具有本文描述的结构特点,并且以一种方式或一种亲和性与 A β 结合,足够引起至少一种下列体内效应: (1) 减少 A β 斑的负荷; (2) 防止斑的形成; (3) 减少可溶性 A β 的水平; (4) 减少与生成淀粉样紊乱有关的神经性病理; (5) 减轻或缓解至少一种与生成淀粉样紊乱有关的生理症状; 和 / 或 (6) 改善认知功能。

[0150] 在另一个优选实施方案中,本发明的人源化抗体具有本文描述的结构特点,并与包含 A β 的 3-7 位残基的表位特异性结合。

[0151] 在另一个优选实施方案中,本发明的人源化抗体具有本文描述的结构特点,以致与 A β 中的 N-末端表位结合 (例如与 A β 的 3-7 位氨基酸中的表位结合),并能够减少 (1) A β 肽的水平; (2) A β 斑的负荷; 以及 (3) 与生成淀粉样紊乱有关的神经性负荷或神经性营养不良。

[0152] 上面描述的活性可以利用任何一种本文描述的或本技术领域中的分析方法来测

定（例如结合分析、吞噬作用分析等）。活性分析可以在体内（例如使用标记的分析成分和 / 或成像技术）也可以在体外（例如使用来自对象的样品或样本）进行。活性可以直接或间接地分析。在某些优选实施方案中，神经学终点（例如淀粉样负荷、神经性负荷等）被分析。这些终点可以在活的对象中（例如在经历免疫治疗的阿茨海默氏病的动物模型中或人类对象中）使用非侵入性的检测方法来分析。此外，这样的终点也可以在对象的尸体解剖中进行分析。在动物模型和 / 或人类对象的尸体解剖中分析这样的终点可用于评估在同样的免疫治疗应用中使用的不同药剂（例如人源化抗体）的功效。在其它的优选实施方案中，行为或神经学参数可以作为上述的神经病理学活性或终点的指标而被评估。

[0153] 3、可变区的生产

[0154] 从概念上已选择了人源化免疫球蛋白的 CDR 和框架组分，生产这种免疫球蛋白的各种方法是可得到的。一般而言，利用基于引物的聚合酶链式反应 (PCR)，抗体重链和 / 或轻链的一个或多个鼠互补决定区 (CDR) 可被人源化，例如，置于一个或多个框架区的情形下。简而言之，设计的引物能够退火至还含有重叠序列的靶鼠 CDR 区，并可与人框架区退火。因此，在适当条件下，引物从鼠抗体模板核酸扩增鼠 CDR，且将部分人框架序列加至扩增的模板。同样，设计的引物能够退火至靶人框架区，其中利用这些引物的 PCR 反应导致扩增的人框架区。当各扩增产物被变性，组合，且退火至其他产物时，与扩增的人框架序列具有重叠的人框架序列的鼠 CDR 区可通过遗传方法连接。因此，在一个或多个这样的反应中，一个或多个鼠 CDR 区可通过遗传方法连接至介入的人框架区。

[0155] 在一些实施方案中，引物还可包含所需的限制性酶识别序列，以利于使所得 PCR 扩增的序列通过基因工程插入较大的基因区段，例如，可变轻链或重链区段，或载体。此外，用于扩增鼠 CDR 区或人框架区的引物具有所需的错配，以致不同密码子导入鼠 CDR 或人框架区。典型的错配引入人框架区的改变，从而保存或改进鼠 CDR 的结构取向及其结合亲和性，如上所述。

[0156] 应理解的是，前述途径可用于使 1 个、2 个或全部 3 个鼠 CDR 区导入介入人框架区的情形。利用基于引物的 PCR 扩增和连接不同序列的方法描述在例如，Sambrook, Fritsch 和 Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) ; DNA Cloning, Vols. 1 和 2, (D. N. Glover, Ed. 1985) ; PCR Handbook Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, Beaucage, Ed. John Wiley & Sons (1999) (编) ; Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel 等, John Wiley & Sons (1992)。

[0157] 由于密码的简并性，编码每个免疫球蛋白氨基酸序列的核酸序列可以有多个。所需的核酸序列可以通过重新固相 DNA 合成或以前制备的所需多核苷酸变体的 PCR 突变来生产。寡核苷酸介导的突变是制备靶多肽 DNA 的取代、缺失和插入变体的优选方法。参见 Adelman 等, DNA 2:183 (1983)。简而言之，通过将编码所需突变的寡核苷酸与单链 DNA 模板进行杂交而改变靶多肽 DNA。杂交后，使用 DNA 聚合酶合成模板的完整的第二条互补链，它掺入寡核苷酸引物并编码选定的靶多肽 DNA 的改变。

[0158] 4、恒定区的选择

[0159] 如上所述产生的抗体可变区段（例如嵌合的或人源化抗体的重链和轻链可变区）通常被连接到至少部分的免疫球蛋白，通常为人免疫球蛋白的恒定区 (Fc 区) 上。人的恒定区 DNA 序列可以使用现有的程序从多种人细胞中分离，但是优选为永生的 B 细胞（参

见 Kabat 等, 同上, 以及 Liu 等, W087/02671) (为所有目的分别以其全文引为参考)。通常轻链和重链恒定区都将包含在抗体中。重链恒定区经常包括 CH1、铰链区、CH2、CH3 和 CH4 区。本文描述的抗体包括了具有所有类型恒定区的抗体, 包括 IgM、IgG、IgD、IgA 和 IgE, 以及任何同种型, 包括 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4。当希望抗体 (例如人源化抗体) 表现出细胞毒性活性时, 恒定结构域通常是补体固定的恒定结构域, 典型的类型为 IgG1。人的同种型 IgG1 是优选的。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 型的。人源化抗体可以包含来自一个以上类别或同种型的序列。抗体可以表达成含有两条轻链和两条重链的四聚体, 表达为分离的重链、轻链, 表达为 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv, 或者表达为单链抗体, 其中重链和轻链可变结构域通过间隔区连接在一起。

[0160] 5、重组抗体的表达

[0161] 嵌合的和人源化抗体一般是通过重组表达来生产的。编码轻链和重链可变区、任选与恒定区相连的核酸被插入表达载体。轻链和重链可以被克隆在相同的或不同的表达载体中。编码免疫球蛋白链的 DNA 区段与表达载体中的控制序列可操作地连接以确保免疫球蛋白多肽的表达。表达控制序列包括但不限于启动子 (例如天然相关的或异源的启动子)、信号序列、增强子元件和转录终止序列。优选情况下, 表达控制序列是能够转化或转染真核宿主细胞 (例如, COS 细胞) 的载体中的真核启动子系统。一旦载体被转入适当的宿主, 宿主就被维持在适合于核苷酸序列的高水平表达、以及适合交叉反应性抗体的收集和纯化的条件之下。

[0162] 这些表达载体通常既可以作为游离基因又可以作为宿主染色体 DNA 的整合部分在宿主生物体中复制。通常, 表达载体含有选择性标记 (例如氨苄青霉素抗性、潮霉素抗性、四环素抗性、卡那霉素抗性或新霉素抗性), 以允许检测那些用所需的 DNA 序列转化的细胞 (参见例如 Itakura 等, 美国专利 4704362)。

[0163] 大肠杆菌 (*E. coli*) 是原核宿主, 在克隆本发明的多核苷酸 (例如 DNA 序列) 方面特别有用。其它适用的微生物宿主包括杆菌, 例如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 和其它肠杆菌, 例如沙门氏菌、沙雷氏菌和多种假单胞菌属的种。在这些原核宿主中, 人们也可以制造表达载体, 通常会含有与宿主细胞相容的表达控制序列 (例如复制起点)。此外, 任何数量的多种已知的启动子都可以存在, 例如乳糖启动子系统、色氨酸 (*trp*) 启动子系统、 β -内酰胺酶启动子系统、或来自 λ 噬菌体的启动子系统。启动子通常任选与操纵基因序列一起控制表达, 并含有核糖体结合位点序列等用于起始和完成转录和翻译。

[0164] 其它的微生物, 例如酵母也可以用于表达。糖酵母 (*Saccharomyces*) 是优选的酵母宿主, 合适的载体具有所需的表达控制序列 (例如启动子)、复制起点、终止序列等。典型的启动子包括 3-磷酸甘油酸激酶和其它糖酵解的酶。其中可诱导的酵母启动子包括来自醇脱氢酶、异细胞色素 C 和负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子。

[0165] 除了微生物以外, 哺乳动物组织细胞培养也可以用来表达和生产本发明的多肽 (例如编码免疫球蛋白及其片段的多核苷酸)。参见 Winnacker, 《从基因到克隆 (From Genes to Clones)》, VCH 出版社, 纽约 (1987)。在实际中真核细胞是优选的, 因为在该领域已经开发了许多能够分泌异源蛋白 (例如完整的免疫球蛋白) 的适合的宿主细胞系, 包括 CHO 细胞系、多种 Cos 细胞系、HeLa 细胞, 优选的是骨髓瘤细胞系或转化的 B 细胞或杂交瘤。优选情况下, 细胞是非人类的。这些细胞的表达载体可以包含表达控制序列, 例如复制

起点、启动子和增强子 (Queen 等, Immunol. Rev. 89 :49 (1986)), 以及必需的加工信息位点, 例如核糖体结合位点、RNA 拼接位点、多聚腺苷化位点和转录终止子序列。优选的表达控制序列是来自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、细胞肥大病毒等的启动子。参见 Co. 等, J. Immunol. 148 :1149 (1992)。

[0166] 此外, 抗体编码序列可以被整合到转化基因用于导入转基因动物的基因组中, 然后在转基因动物的乳汁中表达 (参见例如 Deboer 等, US5741957, Rosen, US5304489, 以及 Meade 等, US5849992)。合适的转基因包括与来自哺乳动物腺特异性基因, 例如酪蛋白或 β -乳球蛋白的启动子和增强子可操作地连接的轻链和 / 或重链的编码序列。

[0167] 此外, 本发明抗体 (例如, 人源化抗体) 可在转基因植物 (例如, 烟草, 玉米, 大豆和紫花苜蓿) 中生产。改进的“植物体 (plantibody)”载体 (Hendy 等 (1999) J. Immunol. Methods 231 :137-146) 和纯化策略与可转化的农作物种类增加偶联致使这类方法成为生产重组免疫球蛋白 (例如, 催化抗体) 的实用和有效手段, 不仅为人和动物治疗, 而且为工业应用。此外, 植物生产的抗体已显示是安全和有效的, 并且防止使用动物衍生的材料, 从而避免了污染有可传播海绵状脑病 (TSE) 因子的风险。而且, 植物和哺乳动物细胞生产的抗体的糖基化形式的差异对抗原结合或特异性具有小的影响或没有影响。加之, 在接受局部口服植物衍生的分泌性二聚 IgA 抗体的患者中没有观察到任何毒性或 HAMA 的证据 (参见 Larrick 等 (1998) Res. Immunol. 149 :603-608)。

[0168] 多种不同的方法已经用来在转基因植物中表达重组抗体。例如, 抗体重链和轻链可独立地克隆至表达载体 (例如, 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 载体), 接着以重组细菌体外转化植物组织, 或利用例如包被有载体的颗粒直接转化, 然后利用例如生物弹物理法导入植物组织。其后, 全植物表达单个链被重构, 接着有性杂交, 最终导致全组装的功能性抗体的生产。相似方案已用来在烟草植物中表达功能性抗体 (参见 Hiatt 等 (1989) Nature 342 :76-87)。在多种不同的实施方案中, 信号序列通过指导链至合适的植物环境 (例如, apoplasm 或其他特异植物组织, 包括茎, 果或籽的水性环境) 可用于促进未组装 抗体链的表达, 结合和折叠 (参见 Fiedler 等 (1995) Bio/Technology 13 :1090-1093)。植物生物反应器也可用来增加抗体产率和显著减少成本。

[0169] 含有目的多核苷酸 (例如重链和轻链编码序列和表达控制序列) 的载体可以根据细胞宿主的类型使用众所周知的方法转化到宿主细胞中。例如氯化钙转染常用于原核细胞, 而磷酸钙处理、电穿孔、脂转染、生物弹 (biolistics) 或基于病毒的转染可以用于其它细胞宿主 (参见 Sambrook 等, 《分子克隆实验指南》(冷泉港出版社, 第二版, 1989), 为所有目的以其全文引为参考)。其它用于转化哺乳动物细胞的方法包括使用 1,5-二甲基-1,5-二氮十一亚甲基聚甲溴化物 (Polybrene)、原生质体融合、脂质体、电穿孔和微注射 (参见 Sambrook 等, 同上)。为了产生转基因动物, 转基因可被微注射到受精卵中, 或者可被整合在胚胎干细胞的基因组中, 然后将这些细胞的核转移到去核卵细胞中。

[0170] 当重链和轻链被克隆在单独的表达载体上时, 载体被共转染以便表达和组装完整的免疫球蛋白。一旦表达, 完整的抗体、它们的二聚体、单个轻链和重链、或本发明的其它免疫球蛋白形式可以通过本技术领域的标准步骤进行纯化, 包括硫酸铵沉淀、亲和柱、柱层析、HPLC 纯化和凝胶电泳等 (参见 Scopes 的《蛋白纯化 (Protein Purification)》(Springer-Verlag 出版社, 纽约, 1982))。对于药用来说, 至少大约 90 到 95% 均一性的基

本上纯的免疫球蛋白是优选的,而 98 到 99%或以上均一性更为优选。

[0171] 6、抗体片段

[0172] 抗体片段也包括在本发明的范围内。在一个实施方案中,提供了非人类的和 / 或嵌合的抗体的片段。在另一个实施方案中,提供了人源化抗体的片段。一般来说,这些片段与抗原特异性结合的亲和性至少为 10^7 、更常见为 10^8 或 $10^9 M^{-1}$ 。人源化抗体片段包括分离的重链、轻链、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fab₂ 和 Fv。片段由重组 DNA 技术产生,或通过完整免疫球蛋白的酶法或化学法分离产生。

[0173] 7. 表位绘图

[0174] 表位绘图以确定 A β 的哪个抗原决定簇或表位被抗体识别。在一个实施方案中,根据替换 NET (rNET) 分析进行表位绘图。rNET 表位图分析提供了有关表位内单个残基对抗体的整个结合活性的贡献的信息。rNET 分析利用合成的系统性单替换肽类似物。相对天生肽(天生抗原)和 19 种替代的“单替换”肽确定在测试抗体的结合,各个“单替换”肽在第一位位置被替换成此位置的 19 种非天生氨基酸之一。生成的图谱反映了该位置替换成各种不同的非天生残基的效果。沿着抗原肽在后续位置生成同样的图谱。然后,组合的图谱,或表位图(反映了在各个位置替换成所有 19 种非天生残基)与第二个抗体类似生成的图进行比较。基本相似或相同的图表明被比较抗体具有相同或相似的表位特异性。

[0175] 8、在动物模型中测试抗体的治疗功效

[0176] 7-9 月龄组的 PDAPP 小鼠每只注射 0.5mg 多克隆抗 A β 或特异性抗 A β 单克隆抗体的 PBS。所有的抗体制备物都被纯化至具有低的内毒素水平。针对片段的单克隆抗体的制备方法是将该片段或长形式的 A β 注射到小鼠中、制备杂交瘤、筛选能够产生特异性结合所需的 A β 片段而不结合其它非重叠的 A β 片段的抗体的杂交瘤。

[0177] 如果需要,在 4 个月的时期内给小鼠进行腹膜内注射,以维持通过 ELISA 滴度测定的循环抗体浓度高于通过针对 A β 42 或其它免疫原的 ELISA 所确定的值的 1/1000。监测滴度,在注射 6 个月末安乐处死小鼠。在尸体解剖后进行组织化学、A β 水平和毒物学分析。每组使用 10 只小鼠。

[0178] 9、筛选具有清除活性的抗体

[0179] 本发明还提供了筛选具有清除活性的抗体的方法,这种抗体能够清除淀粉样沉积或对其来说清除活性是需要的任何其它抗原或相关的生物实体。为了筛选针对淀粉样沉积的活性,来自阿茨海默氏病病人或具有典型的阿茨海默氏病病理的动物模型的脑中的组织样品,在体外培养基中与带有 Fc 受体的吞噬细胞,例如小神经胶质细胞,和测试抗体相接触。吞噬细胞可以是原代培养物也可以是细胞系,可以是鼠源的(例如 BV-2 或 C8-B4 细胞)也可以是人类来源的(例如 THP-1 细胞)。在某些方法中,成分在显微镜载玻片上混合以方便显微镜检测。在某些方法中,多个反应在微孔板的孔中平行进行。在这种格式中,可以在分开的孔中安装分开的微型显微镜载玻片,或者可以使用非显微镜的检测方式例如 A β 的 ELISA 检测。优选情况下,对体外反应混合物中淀粉样沉积的量进行一系列测量,从反应进行前的基线值开始,在反应中测定一个或多个测试值。抗原可以通过染色进行检测,例如使用针对 A β 或淀粉样斑中其它成分的荧光标记抗体。用于染色的抗体可以与被测试清除活性的抗体相同,也可以不同。在与淀粉样沉积的反应过程中相对于基线的减少表明被测试的抗体有清除活性。这样的抗体有可能用于预防或治疗阿茨海默氏病和其它生成淀

粉样疾病。对预防或治疗阿茨海默氏病和其它生成淀粉样疾病特别有用的抗体包括那些对压缩的和扩散的淀粉样斑都能够清除的抗体,例如本发明的 12A11 抗体或其嵌合的或人源化的版本。

[0180] 类似的方法可用于筛选具有清除其它类型生物实体的活性的抗体。这种分析可以用来检测实际上针对任何种类的生物实体的清除活性。一般来说,生物实体在人或动物疾病中扮演某种角色。生物实体可以组织样品或分离的形式提供。对于组织样品来说,它优选不被固定,以便允许更容易接近组织样品的成分并避免伴随着固定发生的对成分构象的干扰。在这种分析中进行测试的组织样品的例子包括癌组织、癌前期的组织、含有良性生长的组织例如疣或痣、被病原微生物感染的组织、渗进了炎性细胞的组织、带有病原性细胞间基质(例如纤维蛋白性心包炎)的组织、带有畸形抗原的组织、以及瘢痕组织。可以使用的分离的生物实体的例子包括 A β 、病毒抗原或病毒、蛋白聚糖、其它病原微生物的抗原、肿瘤抗原和黏附分子。这样的抗原可以从天然来源、重组表达或化学合成等途径获得。组织样品或分离的生物实体在培养基中与带有 Fc 受体的吞噬细胞,例如单核细胞或小神经胶质细胞,以及被测试的抗体一起接触。抗体可以被导向测试的生物实体或与实体相关的抗原。在后一种情况下,目标是测试生物实体是否随着抗原被吞噬。通常情况下,尽管不是必需的,抗体和生物实体(有时带有相关的抗原)在加入吞噬细胞之前预先互相接触。然后检测残留在培养基中的生物实体和/或相关抗原的浓度(如果存在的话)。培养基中的抗原或相关生物实体的量或浓度的降低,表明抗体与吞噬细胞结合在一起具有针对抗原和/或相关生物实体的清除反应。

[0181] 10、具有改变的效应子功能的嵌合/人源化抗体

[0182] 对于上述本发明的含有恒定区(Fc 区)的抗体来说,也可以希望改变分子的效应子功能。一般来说,抗体的效应子功能在于分子的恒定区或 Fc 区,它可以介导与各种效应器分子的结合,例如补体蛋白或 Fc 受体。补体与 Fc 区的结合对于例如细胞病原体的调理作用和裂解以及炎性反应的激活来说是重要的。例如,抗体与效应细胞表面上的 Fc 受体的结合可以引发许多重要的和多样的生物反应,包括例如抗体包被的病原体或微粒的吞入和破坏、免疫复合物的清除、抗体包被的靶细胞被杀伤细胞的裂解(即抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或 ADCC)、炎性介质的释放、抗体的胎盘转移以及免疫球蛋白生产的控制。

[0183] 因此,依赖于具体的治疗或诊断应用,上面提到的免疫功能或仅仅是选定的免疫功能,是可能实现的。通过改变抗体的 Fc 区,分子的效应子功能的各个方面,包括增强或抑制免疫系统的各种反应以及在诊断和治疗中的有益效果,都可以实现。

[0184] 只能与某些类型的 Fc 受体反应的本发明的抗体可以被产生,例如可以对本发明的抗体进行修饰,使其只能与某些 Fc 受体结合,或者如果需要,通过缺失或改变位于抗体 Fc 区中的 Fc 受体结合位点使其完全失去与 Fc 受体的结合。其它所需的对本发明抗体的 Fc 区的改变在下面列出。一般来说,为了实现所需的效应子功能的变化,Kabat 编号系统被用来指明 Fc 区(例如 IgG 抗体的 Fc 区)的哪个(些)氨基酸残基要改变(例如通过氨基酸取代)。这种编号系统也被用于在种间对抗体进行比较,以便在例如小鼠抗体中观察到的所需的效应子功能能够被系统地改造成本发明的人、人源化或嵌合抗体中。

[0185] 例如,已经观察到抗体(例如 IgG 抗体)可以被分组成与 Fc 受体(例如人单核细胞上的 Fc 受体(Fc γ RI)表现为紧密、中等或弱的结合的抗体。通过对这些不同亲和性组中

的氨基酸序列进行比较,鉴定了铰链区中单核细胞结合位点(234位的亮氨酸到239位的丝氨酸)。此外,人的Fc γ RI受体以单体的形式结合人的IgG1和小鼠的IgG2a,但是与小鼠的IgG2b的结合弱100倍。这些蛋白在铰链区中的序列的比较显示出在强结合件(binder)中的234位到238位残基,即亮氨酸-亮氨酸-甘氨酸-甘氨酸-脯氨酸(SEQ ID NO:32)在小鼠的 γ 2b,即弱结合件中变为亮氨酸-谷氨酸-甘氨酸-甘氨酸-脯氨酸(SEQ ID NO:33)。因此,如果需要减少Fc γ I受体的结合,可以在人抗体铰链序列中进行相应的改变。可以理解其它的变化也可以进行以获得相同或相似的结果。例如,Fc γ RI的结合亲和性可以通过用侧链上有不合适的官能团的残基取代特定的残基,或者通过引入带电荷的官能团(例如谷氨酸或天冬氨酸)或例如芳香族非极性残基(例如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸)来改变。

[0186] 这些改变可以同等地应用于鼠、人和大鼠系统,只要在不同的免疫球蛋白之间有序列同源性。已经显示,对于与人Fc γ RI受体结合的人IgG3来说,将235位的亮氨酸改变为谷氨酸破坏了突变体与受体的相互作用。因此这个受体的结合位点可以通过制造适当的突变来打开或关闭。

[0187] 对铰链区附近或临近的位点的突变(例如用丙氨酸取代234、236或237位的残基)表明234、235、236和237位残基的改变至少影响了与Fc γ RI受体的亲和性。因此,本发明的抗体也可以具有改变的Fc区,使得与未修饰的抗体相比对Fc γ RI的结合亲和性改变了。这样的抗体在234、235、236、或237位的氨基酸残基可方便地进行修饰。

[0188] 为了以不同的方式控制免疫反应,与其它Fc受体的亲和性也可以以相似的方法进行改变。

[0189] 作为另一个例子,IgG抗体在与补体的C1成分结合后的裂解性质也可以被改变。

[0190] 补系统的第一组分C1含有3个蛋白,称为C1q、C1r和C1s,它们紧密结合在一起。已经表明C1q负责三蛋白的复合物与抗体的结合。

[0191] 因此,抗体的C1q结合活性可以通过提供带有改变了的CH2结构域的抗体来改变,在该结构域中重链的318、320和322位氨基酸残基中的至少一个已经被改变成具有不同侧链的残基。重链中的残基编号是EU索引编号(参见Kabat等,同上)。其它为改变例如减小或完全破坏C1q与抗体的特异性结合而做的适当的变化包括将318位的谷氨酸、320位的赖氨酸和322位的赖氨酸中的任何一个残基改变成丙氨酸。

[0192] 此外,通过在这些残基进行突变,已经显示只要318位的残基具有氢键侧链,同时320位和322位的残基都具有带正电荷的侧链,则C1q的结合就可以保持。

[0193] 通过用在侧链上带有不合适官能团的残基取代3个特定残基中的任何一个,C1q的结合活性就可以被完全破坏。并不必需只能用丙氨酸代替离子性残基以完全破坏C1q的结合。也可能使用其它的烷基取代的非离子性残基,例如甘氨酸、异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸,或芳香族的非极性残基如苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和脯氨酸代替三个残基中的任何一个来完全破坏C1q的结合。此外,也可能使用极性的非离子性残基如丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸和甲硫氨酸代替320位和322位、而不是318位的残基来破坏C1q的结合活性。

[0194] 另外值得注意的是,离子性或非离子性极性残基上的侧链能够以与谷氨酸残基形成氢键相同的方式来形成氢键。因此,用极性残基取代318位的谷氨酸残基可以修饰但不会完全破坏C1q的结合活性。

[0195] 还已知用丙氨酸残基取代 297 位的天冬酰胺残基可以除去裂解活性,同时只轻微地减弱(大约弱 3 倍)Clq 的亲水性。这个改变破坏了为补体激活所必需的糖基化位点和糖的出现。在该位点的任何其它的取代也将破坏糖基化位点。

[0196] 本发明还提供了具有改变的效应子功能的抗体,该抗体含有修饰的铰链区。修饰的铰链区可以含有完整的铰链区,该铰链区所来自的抗体与 CH1 结构域所来自的抗体属于不同的抗体型或亚型。例如, IgG 型抗体的恒定区(CH1)可以与 IgG4 型抗体的铰链区相连。此外,新的铰链区可以含有天然铰链的一部分或重复的单位,其中重复的每个单位来自天然的铰链区。在一个实施例中,通过将一个或多个半胱氨酸残基转变为中性的残基例如丙氨酸,或将适当位置的残基转变为半胱氨酸残基,可以改变天然的铰链区。进行这样的改变可以使用本领域已知的蛋白化学以及优选为遗传工程技术,如本文所述。

[0197] 在本发明的一个实施方案中,抗体铰链区中的半胱氨酸残基数量被减少到例如一个。这种修饰的优点在于方便了抗体,例如双特异性抗体分子和其中的 Fc 部分已经被效应器或报告分子取代的抗体分子的组装,因为只需要形成单个二硫键。这种修饰还提供了特异性靶,用于通过例如化学途径直接或间接地将该铰链区结合另一个铰链区或结合效应器或报告分子。

[0198] 反过来说,抗体铰链区中的半胱氨酸残基数量也可以增加,例如比正常存在的半胱氨酸残基数量多至少一个。半胱氨酸残基数量的增加可以用来稳定相邻的铰链间的相互作用。这种修饰的另一个优点是它方便了半胱氨酸巯基的使用,以将效应器或报告分子与改变的抗体,例如放射性标记的抗体进行结合。

[0199] 因此,本发明在不同的抗体型,特别是 IgG 型之间提供了铰链区的交换,和/或铰链区中半胱氨酸残基数量的增加或减少,以便获得改变的效应子功能(参见例如美国专利 No. 5677425,专门在此引为参考)。对改变的抗体效应子功能的确定使用本文描述的分析方法或其它本领域已知的技术来进行。

[0200] 重要的是,获得的抗体可以进行一种或多种分析,以评估与起始抗体相比任何的生物活性变化。例如,带有改变的 Fc 区的抗体结合补体或 Fc 受体的能力可以使用此处公开的分析方法和任何本领域已知的分析方法进行评估。

[0201] 本发明的抗体的生产可以使用任何适当的技术进行,包括本文描述的技术和本领域专业技术人员所熟知的技术。例如适当的蛋白序列,例如形成了抗体的部分或全部的相关恒定区如 Fc 区即 CH2 区和/或 CH3 结构域,并且包含了适当的被改变的残基,可以被合成,然后通过化学方法连接到抗体分子中的适当位置。

[0202] 优选情况下,遗传工程技术被用来生产改变的抗体。优选的技术包括例如制备适当的引物用于聚合酶链反应(PCR),以便编码了至少一部分 IgG 重链,例如 Fc 或恒定区(例如 CH2 和/或 CH3)的 DNA 序列在一个或多个残基上被改变了。然后将这个区段与抗体的剩余部分如抗体的可变区以及在细胞中表达所需的调控元件进行可操作的连接。

[0203] 本发明还包括了用于转化细胞系的载体、用于产生转化载体的载体、用转化载体转化的细胞系、用制备载体转化的细胞系以及生产它们的方法。

[0204] 优选情况下,被转化以生产带有改变的 Fc 区(即具有改变的效应子功能)的抗体的细胞系是永生的哺乳动物细胞系(例如 CHO 细胞)。

[0205] 尽管用于生产带有改变的 Fc 区的抗体的细胞系优选为哺乳动物细胞系,但其它

任何合适的细胞系,例如细菌或酵母的细胞系,也可以替代使用。

[0206] 11. 亲和性成熟

[0207] 利用各种亲和性成熟技术,为功能改进可修饰本发明的抗体(例如,人源化抗体)。通常,对给定靶分子具有结合亲和性的候选分子被鉴定后,利用突变技术进一步被改进或“成熟”,从而导致一种或多种相关的候选物对靶分子具有更理想的结合作用。一般而言,正是抗体的亲和性(或亲合力,即抗体对靶抗原的组合亲和性)被修饰,然而,利用亲和性成熟技术,分子的其他属性,诸如稳定性,效应子功能,清除,分泌,或运输功能,或单独或与亲和性平行也可得以修饰。

[0208] 在举例的实施方案中,抗体(例如,本发明人源化抗体)的亲和性增加。例如,具有结合亲和性至少 10^7M^{-1} , 10^8M^{-1} , 或 10^9M^{-1} 的抗体成熟后使得其亲和性至少 10^9M^{-1} , 10^{10}M^{-1} , 或 10^{12}M^{-1} 。

[0209] 使结合分子亲和性成熟的一个方法是合成编码结合分子的核酸或其部分,这些核酸或其部分编码所需的变化。寡核苷酸合成在本领域是众所周知的,并容易自动化以制备一种或多种具有任何所需密码子变化的核酸。限制性位点,沉默突变,以及使用有利的密码子也可以这种方式导入。此外,改变一个或多个密码子来代表特殊氨基酸的子集,例如,排除可形成二硫键的半胱氨酸的子集,并限制至限定区域,例如,CDR 区或其部分。或者,该区域可由部分或全部随机的氨基酸组代表(细节参见,例如, U. S. 专利 Nos. 5, 830, 650 ; 5, 798, 208 ; 5, 824, 514 ; 5, 817, 483 ; 5, 814, 476 ; 5, 723, 323 ; 4, 528, 266 ; 4, 359, 53 ; 5, 840, 479 ; 和 5, 869, 644)。

[0210] 可以理解的是,利用聚合酶链式反应(PCR),上述方法可部分或全部得到实施,PCR 是本领域熟知的,其优点具有将寡核苷酸,例如,具有,例如,所需改变的引物或单链核酸,掺入双链核酸,并以适合于其他操作,诸如遗传工程的扩增量掺入到合适的表达或克隆载体。这种 PCR 的实施条件也可使得核苷酸掺入错误,从而导入其他变异至在扩增的核酸中。实施 PCR 的实验细节和相关的试剂盒,试剂,和引物设计可例如在 U. S. 专利 Nos. 4, 683, 202 ; 4, 683, 195 ; 6, 040, 166 ; 和 6, 096, 551 中找到。利用基于引物的 PCR 将 CDR 区导入抗体框架区的方法描述在例如 U. S. 专利 No. 5, 858, 725 中。例如, U. S. 专利 Nos. 5, 780, 225 ; 6, 303, 313 ; 和 6, 479, 243 描述了基于引物的 PCR 扩增抗体文库的方法(以及根据方法制备的文库),该方法采用最小组的引物,能够发现与较大组的抗体分子具有序列同源性,以致较大和不同组的抗体分子可被有效扩增。定点突变的基于非 PCR 的方法也可使用,并包括利用含单链尿嘧啶的模板和引物的“Kunkel”突变,所述模板和引物杂交,并在通过特殊菌株的大肠杆菌(E. coli)传代时导入突变(参见,例如, U. S. 专利 No. 4, 873, 192)。

[0211] 改变抗体序列或其部分的其他方法包括在非最适(即,错误倾向的)条件下的核酸合成或核酸 PCR,这类核酸的变性和复性(退火),核酸外切酶和/或核酸内切酶消化,接着通过连接或 PCR 重新组装(核酸改组),或一种或多种如上所述技术的组合,例如,参见 U. S. 专利 Nos. 6, 440, 668 ; 6, 238, 884 ; 6, 171, 820 ; 5, 965, 408 ; 6, 361, 974 ; 6, 358, 709 ; 6, 352, 842 ; 4, 888, 286 ; 6, 337, 186 ; 6, 165, 793 ; 6, 132, 970 ; 6, 117, 679 ; 5, 830, 721 ; 和 5, 605, 793。

[0212] 在特定实施方案中,包括在特定部分的候选抗体分子,例如,在一个或多个 CDR 区

域(或其部分),一个或多个框架区,和/或一个或多个恒定区(例如,具有效应子功能的恒定区)中具有多样性的候选抗体分子家族的抗体文库(或亲和性成熟文库),利用本领域公知的技术(参见,例如,U.S. 专利 Nos. 6, 291, 161 ;6, 291, 160 ;6, 291, 159 ;和 6, 291, 158)可对所需的属性加以表达和筛选。例如,具有各种 CDR3 序列的抗体可变区的表达文库,和通过突变导入各种 CDR3 序列而制备具有各种 CDR3 序列的人抗体文库以及回收该文库的方法,可得以构建(参见,例如,U.S. 专利 No. 6, 248, 516)。

[0213] 最后,为表达亲和性成熟抗体,编码候选抗体的核酸,利用标准载体和细胞转染/转化技术(参见,例如,U.S. 专利 Nos. 6, 331, 415 ;6, 103, 889 ;5, 260, 203 ;5, 258, 498 ;和 4, 946, 778),可以适当表达方式,例如,作为全长抗体重链和轻链(例如,IgG),抗体 Fab 片段(例如,Fab,F(ab')₂),或作为单链抗体(scFv),被导入细胞。

[0214] B、编码免疫和治疗剂的核酸

[0215] 针对淀粉样沉积的免疫反应也可以通过给药编码用于被动免疫的抗体和它们的组分链的核酸来诱导。这样的核酸可以是 DNA 或 RNA。编码免疫原的核酸区段一般连接到调控元件如启动子和增强子上,以便允许 DNA 区段在病人的目的靶细胞中表达。当希望在血细胞中表达以诱导免疫反应时,示例的启动子和增强子元件包括那些来自轻链或重链免疫球蛋白基因的启动子和增强子元件和/或 CMV 的主要中早期启动子和增强子(Stinski, U.S. 专利 Nos. 5, 168, 062 和 5, 385, 839)。相连的调控元件和编码序列通常被克隆在载体中。对于给药双链抗体而言,两条链可以被克隆在同一个的或分开的载体中。

[0216] 有许多病毒载体系统可以使用,包括逆转录病毒系统(参见例如 Lawrie 和 Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3 :102-109(1993)),腺病毒载体(参见例如 Bett 等, J. Virol. 67 :5911(1993)),腺伴随病毒载体(参见例如 Zhou 等, J. Exp. Med. 179 :1867(1994)),来自痘病毒科包括痘苗病毒和鸟痘病毒的病毒载体,来自 α 病毒属例如源自 Sindbis 和 Semliki 森林病毒的病毒载体(参见例如 Dubensky 等, J. Virol. 70 :508(1996)),委内瑞拉马脑炎病毒(参见 Johnston 等, US 5643576)和棒状病毒,例如水泡性口膜炎病毒(参见 Rose, 6168943)和乳头瘤病毒(Ohe 等, Human Gene Therapy 6 :325(1995);Woo 等, WO 94/12629;以及 Xiao&Brandsma, Nucleic Acids. Res. 24, 2630-2622(1996))。

[0217] 编码免疫原的 DNA 或含有它的载体可以被包装到脂质体中。适用的脂类和相关的类似物在 Eppstein 等 US5208036、Felgner 等 US5264618、Rose 等 US5279833 和 Eband 等 US5283185 中有描述。载体和编码免疫原的 DNA 也可以被吸附到微粒载体上或与其相连,其例子包括聚甲基丙烯酸甲酯聚合物和聚丙交酯和聚(丙交酯-乙交酯共聚物),参见例如 McGee 等, J. Micro Encap. (1996)。

[0218] 基因治疗载体或裸露的多核苷酸(例如 DNA)可以通过施用于单个病人投送到体内,一般是通过全身给药(例如静脉内、腹膜内、鼻腔、胃部、皮内、肌内、皮下或颅内灌注)或局部给药(参见例如 Anderson 等, US5399346)。术语“裸露的多核苷酸”是指不与转染促进剂相连投送的多核苷酸。裸露的多核苷酸有时被克隆在质粒载体中。这样的载体还可以包括促进剂例如布比卡因(bupivacaine)(Weiner 等,US5593972)。DNA 也可以使用基因枪给药。参见 Xiao & Brandsma,同上。编码免疫原的 DNA 被沉淀在细微金属珠的表面上。微弹丸用冲击波或膨胀的氦气加速,穿透组织达到几个细胞层的深度。例如由 Agriscetus,

Inc. (Middleton WI) 生产的 Accel™ 基因投送装置是适用的。此外,裸露的 DNA 也可以简单地通过将 DNA 点在用化学或机械刺激的皮肤上而穿透皮肤进入血流(参见 Howell 等,WO 95/05853)。

[0219] 在另一种修改的方法中,编码免疫原的载体可以在离体投送到细胞,例如从单个病人体内移植出的细胞(例如淋巴细胞、骨髓抽出物、活组织切片)或全能性的供体造血干细胞中,然后将细胞重新植入到病人中,这通常是在筛选到整合了载体的细胞之后进行。

[0220] II、预防和治疗方法

[0221] 本发明特别针对阿茨海默氏病和其它生成淀粉样疾病的治疗,这是在病人中产生有益的治疗反应(例如在病人中诱导 A β 的细胞吞噬作用,减少斑的负荷,抑制斑的形成,减轻神经性营养不良,改善认知功能,和/或逆转、治疗或防止认知减退)例如以预防或治疗生成淀粉样疾病的条件下,给病人给药针对 A β 内的特异性表位的治疗性免疫药剂(例如人源化免疫球蛋白)来进行的。本发明也涉及了本发明公开的免疫药剂(例如人源化免疫球蛋白)在制备用于治疗或预防生成淀粉样疾病的药物中的应用。

[0222] 一方面,本发明提供了预防或治疗与 A β 在病人的脑中淀粉样沉积有关的疾病的方法。这样的疾病包括阿茨海默氏病、Down 氏综合症和认知缺损。后者可以伴随或不伴随生成淀粉样疾病的其它特征而出现。本发明的某些方法包括给病人给药有效剂量的能够特异性结合淀粉样沉积的某种成分的抗体。这样的方法对于在人类病人中预防或治疗阿茨海默氏病特别有用。示例的方法包括给药有效剂量的能够结合 A β 的抗体。优选的方法包括给药有效剂量的能够与 A β 的 1-10 位残基中的表位特异性结合的抗体,例如能够与 A β 的 1-3 位残基中的表位特异性结合的抗体,能够与 A β 的 1-4 位残基中的表位特异性结合的抗体,能够与 A β 的 1-5 位残基中的表位特异性结合的抗体,能够与 A β 的 1-6 位残基中的表位特异性结合的抗体,能够与 A β 的 1-7 位残基中的表位特异性结合的抗体,或能够与 A β 的 3-7 位残基中的表位特异性结合的抗体。在另一方面,本发明的特征在于给药能够与含有 A β 的游离 N-端残基的表位结合的抗体。在另一方面,本发明的特征在于给药能够与 A β 的 1-10 位残基中的表位结合的抗体,其中 A β 的 1 位和/或 7 位残基是天冬氨酸。在另一方面,本发明的特征在于给药能够与 A β 肽特异性结合而不与全长的淀粉样肽前体蛋白(APP)结合的抗体。在另一方面,抗体的同种型是人 IgG1。

[0223] 在另一方面,本发明的特征在于给药能够在病人中与淀粉样沉积结合并诱导针对淀粉样沉积的清除反应的抗体。例如,这样的清除反应可以由 Fc 受体介导的细胞吞噬作用所实施。

[0224] 本发明的治疗药剂一般来说是基本上纯的,不含不想要的污染物。这意味着药剂一般为至少大约 50% w/w(重量/重量)纯,并且基本上不含有干扰性蛋白和污染物。有时药剂是至少大约 80% w/w 纯,更优选为至少 90% 或大约 95% w/w 纯。但是,使用常规的蛋白纯化技术,可以获得至少 99% w/w 纯的均一肽。

[0225] 方法既可以用于无症状的病人也可以用于目前显示出疾病症状的病人。在这些方法中使用的抗体可以是人类的、人源化的、嵌合的或非人类的抗体或其片段(例如抗原结合片段),并且可以是单克隆的,也可以是多克隆的,如本文所描述。在另一方面,本发明的特征在于给药从用 A β 肽免疫的人中获得的抗体,该人可以是准备用抗体进行治疗的病人。

[0226] 在另一方面,本发明的特征在于以药物载体和抗体作为药物组合物给药。此外,抗体也可以通过给药编码至少一条抗体链的多核苷酸而施用给病人。多核苷酸在病人中表达产生了抗体链。任选地,多核苷酸也可以编码抗体的重链和轻链。多核苷酸在病人中表达产生了重链和轻链。在示例的实施方案中,监测病人的血液中被给药的抗体的水平。

[0227] 因此,本发明满足了一个长期存在的、对用来预防或缓解与阿茨海默氏病有关的神经性疾病以及某些病人中的认知损伤的治疗方案的需要。

[0228] A、适合治疗的病人

[0229] 适合治疗的病人包括有疾病危险但是还没有显示出症状的个体以及现在已经显示出症状的病人。对于阿茨海默氏病来说,实际上任何人,如果他或她活得足够长,都有患阿茨海默氏病的危险。因此,本方法可以预防性地给药给普通人群而不需要任何给对象患者的危险进行评估。本方法对于已知在遗传上有患阿茨海默氏病危险的个体来说特别有用。这样的个体包括那些有亲属患有该病的个体,以及那些其危险通过遗传或生化标记物分析被确定的个体。阿茨海默氏病患病的遗传标记物包括 APP 基因上的突变,特别是在 717 位以及 670 和 671 位上的突变,它们分别被称为 Hardy 和 Swedish 突变(参见 Hardy, 同上)。其它的危险标记物是早老素基因、PS1 和 PS2、ApoE4 上的突变,以及 AD、高胆固醇血症或动脉粥样硬化的家族史。现在患有阿茨海默氏病的个体可以从特征性的痴呆以及上述的危险因素的存在识别出来。此外,许多诊断测试可用来鉴定患有 AD 的个体。这些测试包括测定 CSF τ 和 A β 42 的水平。升高的 τ 和降低的 A β 42 水平表明存在 AD。患有阿茨海默氏病的个体也可以通过 ADRDA 标准进行诊断,这在实施例部分中讨论。

[0230] 在没有显示出症状的病人中,治疗可以在任何年龄开始(例如 10、20、30 岁)。但是通常在病人达到 40、50、60 或 70 岁之前并不需要开始治疗。治疗一般需要在一段时期内使用多个剂量。治疗可以通过分析随时间变化的抗体水平来监测。如果反应下降,表明需要加强剂量。对于潜在的 Down 氏综合症病人,治疗可以在出生前通过将治疗药剂施用给母亲来开始,也可以在出生后马上开始。

[0231] B、治疗方案和剂量

[0232] 在预防应用中,药物组合物或药物被给药至易于患有、或有危险患阿茨海默氏病的病人,其量足够消除或减少疾病的危险,减轻疾病的严重性,或延缓疾病的发作,包括疾病的生化、组织学和/或行为学上的症状,以及在疾病发展过程中出现的并发症和中间的病理表型。在治疗应用中,组合物或药物被给药至怀疑患有、或已患有该病的病人,其量足够治愈、或至少部分阻止疾病的症状(生化、组织学和/或行为学上的症状),包括在疾病发展过程中出现的并发症和中间的病理表型。

[0233] 在某些方法中,给药药剂在还没有发展出特征性的阿茨海默氏病病理的病人中减少或消除了肌认知(myocognitive)损伤。足够实现治疗或预防性治疗的量被定义为治疗或预防有效剂量。在预防和治疗方案中,药剂经常以几种剂量给药直到产生足够的免疫反应。术语“免疫反应”或“免疫学反应”包括发展出针对受试对象中的抗原的体液的(抗体介导的)和/或细胞的(由抗原特异性 T 细胞或它们的分泌产物介导的)反应。这样的反应可以是主动反应,即由给药免疫原而诱导,也可以是被动的反应,即由给药免疫球蛋白或抗体或接触过抗原的 T 细胞而诱导。一般来说,免疫反应被监测,如果免疫反应开始减小就施用重复的剂量。

[0234] 对于上述病症的治疗来说,本发明组合物的有效剂量依赖于许多不同的因素而变化,包括给药方法、靶位点、病人的生理状态、患者是人还是动物、其它施用的药物、以及处理是预防性的还是治疗性的。通常患者是人,但是非人类的哺乳动物包括转基因哺乳动物也可以被治疗。治疗剂量需要被滴定以最优化安全性和功效。

[0235] 对于使用抗体的被动免疫来说,剂量范围从每公斤宿主体重大约 0.0001 到 100mg、更经常从 0.01 到 5mg(例如 0.02mg/kg, 0.25mg/kg, 0.5mg/kg, 0.75mg/kg, 1mg/kg, 2mg/kg 等)。例如,剂量可以是 1mg/kg 体重或 10mg/kg 体重或者在 1-10mg/kg 体重的范围内,优选至少为 1mg/kg。在另一实施方案中,剂量为 0.5mg/kg 体重,或 15mg/kg 体重或在 0.5-15mg/kg 范围内,优选至少 1mg/kg。在上述范围内中间的剂量值也包括在本发明的范围内。对象的给药可以每天、隔日、每周或根据经验分析确定的任何其它方案进行。示例的治疗需要在延长的时期内,例如至少 6 个月内以多次剂量给药。另一个示例的治疗方案需要在每两周给药一次或一个月给药一次或每 3-6 个月给药一次。示例的计量方案包括每天连续给药 1-10mg/kg 或 15mg/kg,隔天给药 30mg/kg 或每周给药 60mg/kg。在某些方法中,两种或以上的具有不同特异性的单克隆抗体被同时给药,其中每种给药的抗体的剂量落入上述的范围内。

[0236] 抗体通常给药多次。单次剂量之间的间隔可以是一周、一月或一年。间隔也可以是不规则的,正如通过测量病人血液中针对 A β 的抗体的水平所指示的那样。在某些方法中,剂量被调整到血浆中的抗体浓度为 1-1000 μ g/ml,而在某些方法中调整到 25-300 μ g/ml。此外,抗体也可以以缓释制剂的方式给药,在这种情况下只需要较少频率的给药。剂量和频率依赖于抗体在病人中的半衰期而变化。一般来说,人源化抗体显示出最长的半衰期,然后是嵌合抗体和非人类抗体。

[0237] 给药的剂量和频率可以依赖于处理是预防性的还是治疗性的而变化。在预防性应用中,含有本发明抗体或其混合物(cocktail)的组合物被施用给还没有处于疾病状态的病人以增强病人的抵抗力。这样的量被定义为“预防有效剂量”。在这种应用中,准确的量还是依赖于病人的健康和总体免疫状态,但是一般范围从每剂 0.1mg 到 25mg,特别是每剂 0.5mg 到 2.5mg。相对低的剂量在长的时间期内以相对长的间隔给药。某些病人在他们的余生中持续接受治疗。

[0238] 在治疗性应用中,有时需要相对高的剂量(例如从每剂大约 1mg 到 200mg 抗体,其中更常用的剂量是从 5 到 25mg)以相对短的间隔给药,直到疾病的发展被减弱或终止,在优选情况下直到病人显示出部分或完全的改善病症。此后,病人可以采用预防性的方案给药。

[0239] 编码抗体的核酸的剂量范围为每个病人从大约 10ng 到 1g、100ng 到 100mg、1 μ g 到 10mg、或 30-300 μ g DNA。感染性病毒载体的剂量变化范围从每剂 10 到 100 个病毒粒子或更多。

[0240] 对于预防性和/或治疗性处理,治疗剂可以以肠胃外、局部、静脉内、口服、皮下、动脉内、颅内、腹膜内、鼻腔内或肌内的方式给药。免疫原性药剂最典型的给药途径是皮下,尽管其它的途径同样有效。第二个最常见的途径是肌内注射。这种类型的注射最典型是在手臂或腿的肌肉中进行。在某些方法中,药剂被直接注射到积累了沉积的特定组织中,例如颅内注射。对于抗体的给药来说,肌内注射或静脉内灌注是优选的。在某些方法中,特定的治疗抗体被直接注射到颅内。在某些方法中,抗体以缓释组合物或装置的方式给药,例如

Medipad™ 装置。

[0241] 本发明的药剂可任选与在治疗致淀粉样疾病中至少部分有效的其他药剂组合给药。在某些实施方案中,本发明的人源化抗体(例如,人源化 12A11)与第二免疫原性或免疫学药剂组合给药。例如,本发明的人源化 12A11 抗体可与另一针对 Aβ 的人源化抗体组合给药。在其他实施方案中,人源化 12A11 抗体给药至已接受或正在接受 Aβ 疫苗的患者。在脑中出现淀粉样沉积的阿茨海默氏和 Down 氏综合症的情形下,本发明的药剂也可与增加本发明药剂穿过血脑屏障的其他药剂协同给药。本发明的药剂还可与提高治疗剂接近靶细胞或组织的其他药剂,例如,脂质体等组合给药。共同给药这些药剂可降低取得理想效果所需的治疗剂(例如,治疗性抗体或抗体链)的剂量。

[0242] C、药物组合物

[0243] 本发明的药剂通常以包含活性治疗剂,即多种其它的可药用成分的药物组合物的形式给药。参见《Remington's Pharmaceutical Science》(第 15 版, Mack 出版公司, Easton, Pennsylvania(1980))。优选的形式依赖于所需的给药方式和治疗用途。依赖于所需的制剂,组合物中也可以包括可药用的、无毒性的载体或稀释剂,它们被定义为通常用来配制药物组合物以便给药给动物或人的载体。稀释剂的选择以不影响混合物的生物活性为根据。这样的稀释剂的例子是蒸馏水、生理磷酸盐缓冲液、Ringer 氏溶液、葡萄糖溶液以及 Hank 氏溶液。此外,药物组合物或制剂也可以包括其它载体、佐剂或无毒、无治疗性、无免疫原性的稳定剂等。

[0244] 药物组合物也可以包括大的、代谢缓慢的大分子,例如蛋白,多糖如壳聚糖、聚乳酸、聚羟基乙酸和共聚物(例如胶乳官能化的琼脂糖凝胶(TM)、琼脂糖、纤维素等),聚氨基酸,氨基酸共聚物和脂类聚集体(例如油滴或脂质体)。此外,这些载体可以作为免疫刺激试剂(即佐剂)。

[0245] 对于肠胃外给药来说,本发明的药剂可以以可注射剂量的方式给药,这种药剂是物质的生理可接受的稀释剂与药用载体的溶液或悬浮液,所述药用载体可以是灭菌的液体,例如水油、盐水、甘油或乙醇。此外,辅助物质例如润湿剂或乳化剂、表面活性剂、pH 缓冲物质等也可以出现在组合物中。药物组合物的其它成分是来源于石油、动物、蔬菜的成分或合成的成分,例如花生油、大豆油和矿物油。一般来说,二元醇类物质例如丙二醇或聚乙二醇是优选的液体载体,特别是对可注射溶液而言。抗体可以以团注(depot injection)或植入制备物的方式给药,其配制方式允许活性成分的持续释放。示例的组合物包括 5mg/mL 单克隆抗体,配制在由 50mM L-组氨酸、150mM NaCl 组成的缓冲水溶液中,用 HCl 将 pH 调整到 6.0。

[0246] 一般来说,组合物被制成可注射的液体溶液或悬浮液;在注射前适合于溶解或悬浮于液体载体中的固体形式也可以制备。制备物也可以被乳化或密封在脂质体或微粒中,例如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物,以增强佐剂的效果,如前面所讨论的(参见 Langer, Science 249:1527 (1990) 和 Hanes, Advanced Drug Delivery Reviews 28:97(1997))。本发明的药剂可以以团注或植入制备物的方式给药,其配制方式允许活性成分的持续或脉动式释放。

[0247] 适合于其它的给药方式的其他制剂包括口服、鼻腔内和肺部制剂、栓剂和透皮敷用。对于栓剂来说,结合剂和载体包括例如聚乙二醇或甘油三酯;这样的栓剂可以从含有

0.5%到10%、优选为1%到2%的活性成分的混合物形成。口服制剂包括赋形剂,例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素和碳酸镁。这些组合物采取溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉剂的形式,并含有10%到95%的活性成分,优选为25%到70%的活性成分。

[0248] 局部施用可以产生透皮的或皮内的投药。通过将药剂与霍乱毒素或其脱毒的衍生物或亚基或其它相似的细菌毒素共同给药,可以使局部给药更加便利(参见Glenn等, Nature 391,851(1998))。共同给药可以通过将成分作为混合物或通过化学交联获得的连接分子使用,或表达为融合蛋白而得以完成。

[0249] 此外,透皮投药可以通过使用皮肤贴片或使用转移体(transfersomes)来实现(Paul等, Eur. J. Immunol. 25:3521(1995); Cevc等, Biochem. Biophys. Acta 1368:210-15(1998))。

[0250] D、治疗过程的监控

[0251] 本发明提供了在患有或易于患有阿茨海默氏病的病人中监控治疗,即监控对病人给药的治疗过程的方法。该方法既可用于监控对有症状的病人的治疗性处理,也可用于监控对无症状的病人的预防性处理。本方法对于监控被动免疫(例如测量被给药的抗体的水平)特别有用。

[0252] 某些方法需要在给药剂量的药剂之前测定基线值,例如病人中的抗体水平或分布,并将它与治疗后的分布或水平值进行比较。水平或分布值显著增加(即在同样样品的重复测量中大于典型的实验误差幅度,被表示为这些测量值的平均值的一个标准偏差)表明正的治疗结果(即给药药剂产生了预期的反应)。如果免疫反应的值没有明显的变化或者降低,表明了负的治疗结果。

[0253] 在其它方法中,从对照人群测定水平或分布的对照值(即平均值和标准偏差)。一般来说,对照人群中的个体以前没有接受过治疗。然后将给药治疗剂后病人的水平或分布的测量值与对照值进行比较。相对于对照值的显著增加(例如大于平均值的一个标准偏差)表明了正的或充分的治疗结果。缺少明显的增加或减少表明负的或不充分的治疗结果。一般来说,当连续给药药剂时水平相对于对照值是增加的。如前所述,相对于对照值达到平台表明给药治疗可以中断,或者可以减少剂量和/或频率。

[0254] 在其它方法中,水平或分布的对照值(如平均值和标准偏差)是从对照人群测定的,其中的个体已经经历了治疗剂的治疗,并且他们的水平或分布对治疗的反应已经达到了平台。将病人中测定的水平或分布值与对照值进行比较。如果病人中测量的水平与对照值没有明显的区别(例如超过一个标准偏差),治疗可以中断。如果病人中的水平明显低于对照值,保证连续的药剂给药。如果病人中的水平保持低于对照值,那么表明治疗需要改变。

[0255] 在其他方法中,现在没有接受治疗但是以前经历了一个疗程的病人被监测抗体的水平或分布,以确定是否需要恢复治疗。病人中测定的水平或分布与以前在经过一个疗程治疗的病人中获得的值进行比较。相对于以前测量值的明显的减少(即在同样样品的重复测量中大于典型的实验误差的界限)表明治疗可以恢复。此外,病人中的测量值可以与在经历过一个疗程的病人人群中测定的对照值(平均值加标准偏差)进行比较。或者,病人中的测量值还可以与在经历过预防治疗并仍然没有表现出症状的病人人群中、或经历过

治疗性治疗并表现出疾病特征减轻的病人人群中测定的对照值进行比较。在所有这些情况中,相对于对照值的明显减少(即大于标准偏差)表明治疗应该在病人中恢复。

[0256] 典型的用于分析的组织样品是病人的血液、血浆、血清、粘液或脑脊液。样品被分析例如针对 A β 肽的抗体的水平或分布,例如人源化抗体的水平或分布。检测特异性针对 A β 的抗体的 ELISA 方法在实施例部分中描述。在某些方法中,被给药的抗体的水平或分布使用清除分析来确定,例如本文描述的体外细胞吞噬分析。在这些方法中,来自测试病人的组织样品与淀粉样沉积(例如来自 PDAPP 小鼠)和带有 Fc 受体的吞噬细胞相接触。然后监控随后发生的淀粉样沉积的清除。清除反应的出现和程度指示了在测试病人的组织样品中有效清除 A β 的抗体的存在和水平。

[0257] 一般来说在被动免疫后抗体的分布在抗体浓度上显示出瞬时峰,随后指数性地衰减。在没有进一步剂量的情况下,依赖于给药的抗体的半衰期,这种衰减在几天到几个月的时期内接近治疗前的水平。

[0258] 在某些方法中,在给药前测定病人中针对 A β 的抗体的基线值,在给药后马上测定第二个值以确定抗体的峰值水平,此后在不同的间隔时间进一步进行一个或多个测定以监测抗体水平的衰减。当抗体水平降低到基线值或峰值与基线值差的预定的百分数(例如 50%、25%或 10%)时,需要给药另一剂抗体。在某些方法中,峰值或随后测量的水平减去背景值与以前测定的参比水平进行比较,以在其它病人中建立有益的预防性或治疗性处理方案。如果测量的抗体水平明显低于参比水平(例如低于在从治疗中得到改善的病人人群的参比值的平均值减一个标准偏差),表明需要给药另一剂抗体。

[0259] 其它的方法包括在治疗过程中监测任何本技术领域熟知的研究人员或医生常规依赖的生理症状(例如身体或精神上的症状),以诊断或监测生成淀粉样疾病(例如阿茨海默氏病)。例如,人们可以监测认知缺损。后者是阿茨海默氏病和 Down 氏综合症的症状,但是也可以不伴随这些疾病的其它特征而发生。例如,认知缺损可以在治疗全过程中根据常规通过测定病人在小精神状态检查(Mini-Mental State Exam)中的分数而监测。

[0260] E、试剂盒

[0261] 本发明还提供了用于进行上述监测方法的试剂盒。一般来说,这样的试剂盒包含了能够与针对 A β 的抗体特异性结合的试剂。试剂盒也可以包含标记物。为了检测针对 A β 的抗体,标记物一般是标记的抗独特型抗体的形式。为了检测抗体,试剂可以预先结合在固相上,例如预先结合在微量滴定板的孔上。一般来说,试剂盒也含有标签,为试剂盒的使用提供指导。标签也可以包括图或其它对应方案,提供测量的标记的水平与针对 A β 的抗体的水平的相关性。术语“标签”是指在试剂盒生产、运输、销售或使用过程中,任何时候贴在上面或伴随它的任何书面的或记录的材料。例如,术语“标签”包含了广告传单和小册子、包装材料、说明书、音频或视频卡带、计算机盘以及直接印刷在试剂盒上的文字。

[0262] 本发明还提供了诊断试剂盒,例如研究、检测盒和/或诊断试剂盒(例如用于进行体内成像)。这样的试剂盒一般包括与 A β 的表位结合的抗体,优选为 1-10 位残基中的表位。在优选情况下,抗体被标记,或者在试剂盒中包括第二个标记试剂。优选情况下,试剂盒被标注有说明书,以便进行所需的应用,例如进行体内成像分析。示例的抗体在本文中有描述。

[0263] F、体内成像

[0264] 本发明提供了在病人中对淀粉样沉积进行体内成像的方法。这样的方法对阿茨海默氏病或对其易感性的诊断或诊断的确认是有用的。例如,这些方法可以用于表现出痴呆症状的病人。如果病人有异常的淀粉样沉积,那么病人就可能患有阿茨海默氏病。这些方法也可以用于无症状的病人。存在异常的淀粉样沉积表明对将来有症状的疾病有易感性。这些方法也可用于监测在以前已经被诊断为阿茨海默氏病的病人中疾病的进展和 / 或治疗的反应。

[0265] 这些方法的实施是将试剂例如结合 A β 的抗体给药至病人,然后在试剂结合后检测它。优选的抗体在病人中结合 A β 沉积但是不结合全长的 APP 多肽。与 A β 的 1-10 位氨基酸中的表位结合的抗体是特别优选的。在某些方法中,抗体与 A β 的 7-10 位氨基酸中的表位结合。这样的抗体一般结合但不诱导大量的清除反应。在另一些方法中,抗体与 A β 的 1-7 位氨基酸中的表位结合。这样的抗体一般结合并且诱导针对 A β 的清除反应。但是,清除反应可以通过使用缺少全长的恒定区的抗体片段例如 Fabs 来避免。在某些方法中,同样的抗体既可用于治疗试剂也可用作诊断试剂。一般来说,与 A β 的 C-端至 10 位残基的表位结合的抗体并不显示出同与 1-10 位残基内的表位结合的抗体一样强的信号,推测是因为 C-端的表位在淀粉样沉积中是不可进入的。因此这样的抗体不是优选的。

[0266] 诊断试剂可以通过静脉内注射给药到病人的身体中,也可以通过颅内注射或在颅骨上钻孔直接给药到脑中。试剂的剂量应该在与治疗方法中所用的相同的范围内。一般来说试剂是标记的,尽管在某些方法中,与 A β 有亲和性的一级试剂没有标记,而是使用了二级标记试剂来结合一级试剂。标记的选择依赖于检测的方法。例如荧光标记适合于光学检测。使用顺磁标记适合于 X 线断层摄影检测而不需要外科的介入。放射性标记也可以使用 PET 或 SPECT 检测。

[0267] 诊断通过将标记位点的数量、大小和 / 或强度与相应的基线值比较而进行。基线值可以代表在无病的个体人群中的平均水平。基线值也可以代表在同一个病人中以前测定的水平。例如,基线值可以在病人开始治疗前测定,然后将治疗后的测定值与基线值进行比较。相对于基线,值的减少表明对治疗的正反应。

[0268] 本发明将通过下面非限制性的实施例进行更全面的描述。

[0269] 实施例

[0270] 下列序列号用于整个实施例中,以参考免疫球蛋白链可变区核苷酸和氨基酸序列。

[0271]	抗体	<u>VL 核苷酸序列</u>	<u>VL 氨基酸序列</u>	<u>VH 核苷酸序列</u>	<u>VH 氨基酸序列</u>
--------	----	-----------------	-----------------	-----------------	-----------------

[0272]	12A11	SEQ ID NO :1 (编码)	SEQ ID NO :2	SEQ ID NO :3 (编码)	SEQ ID NO :4
--------	-------	-------------------	--------------	-------------------	--------------

[0273]	12A11v1	SEQ ID NO :34	SEQ ID NO :7	SEQ ID NO :35	SEQ ID NO :10
--------	---------	---------------	--------------	---------------	---------------

[0274]	12A11v2		SEQ ID NO :7		SEQ ID NO :13
--------	---------	--	--------------	--	---------------

[0275]	12A11v2.1		SEQ ID NO :7		SEQ ID NO :14
--------	-----------	--	--------------	--	---------------

[0276] 12A11v3 SEQ ID NO :7 SEQ ID NO :
15

[0277] 12A11 SEQ ID NO :5 SEQ ID NO :6

[0278] 如在此所用,包括 SEQ ID NOs :1-4 任一所述的 VL 和 / 或 VH 序列的抗体或免疫球蛋白序列可含有全长序列或可含有成熟序列 (即,没有信号肽或前导肽的成熟肽)。

[0279] 前述研究已表明,有可能预测各种不同的 A β 抗体通过抗体离体结合斑的能力 (例如在 PDAPP 或 AD 脑区) 在减轻 AD- 相关的神经病理学 (例如,斑负荷) 上的体内功效和 / 或触发离体噬菌分析中的斑清除 (Bard 等 (2000) Nat. Med. 6 :916-919)。关联支持了下列概念:通过小神经胶质细胞和 / 或巨噬细胞的 Fc- 依赖的吞噬作用对体内斑清除过程至关重要。然而,已有报道,抗体功效也可通过独立于 Fc 相互作用的机理体内获得 (Bacskai 等 (2002) J. Neurosci. 22 :7873-7878)。研究表明,针对 A β 中间部分的抗体不可识别淀粉样斑,似乎结合至可溶性 A β 并减轻斑沉积 (DeMattos 等 (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 :8850-8855)。

[0280] 为了表征鼠单克隆抗体 12A11 (同种型 IgG1) 潜在的体内功效,首先进行各种不同的离体分析。

[0281] mAb 12A11 对 A β 1-42 的亲合力。单克隆抗体 12A11 与聚集的合成 A β 1-42 的结合通过 ELISA 进行,如 Schenk 等 (Nature 400 :173 (1999)) 中所述。为比较目的,还分析了 mAbs 12B4 和 10D5。可溶性 A β 1-42 是指在二甲基亚砜 (DMSO) 中超声的合成 A β 1-42 肽。20 μ g/ml 的抗体系列稀释后与 50,000cpm [125 I]A β 1-42 (190 μ Ci/ μ mol; 标记有 Iodogen reagent, Pierce) 室温下温育过夜。50 微升含有 75mg/ml 蛋白 A Sepharose (Amersham Pharmacia) 和 200 μ g 兔抗小鼠 IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch) 的浆液与稀释抗体室温下温育 1 小时,洗涤两次,用 Wallac γ 计数器 (Perkin-Elmer) 计数。所有步骤在组成为 10mM Tris, 0.5M NaCl, 1mg/ml 白明胶,和 0.5% Nonidet P-40, pH 8.0 的 RIA 缓冲液中进行。

[0282] 亲合力研究结果示于下表 2 中。

[0283] 表 2:

[0284]

抗体	表位	同种型	聚集 A β 1-42 的 ED ₅₀ , pM	可溶性 A β 1-42 的捕获率%
10D5 [†]	A β 3-7	IgG1	53	1
12B4 [†]	A β 3-7	IgG2a	667	8
12A11	A β 3-7	IgG1	233	30

[0285] [†] 抗体 10D5 和 12B4 分别详细描述在 WO 02/46237 和国际专利申请号 PCT/US03/07715。

[0286] * 作为比较,抗体 266 浓度为 10 μ g/ml 时将捕获 70% 的 A β 1-42。

[0287] 所有测试抗体对聚集的 A β 1-42 显示高亲合力。而且,抗体 12B4 和 12A11 在浓度为 20 μ g/ml 时明显捕获可溶性 A β 1-42。如表 2 所示,IgG1 抗体 12A11 比 IgG2a 抗体 12B4 或 IgG1 抗体 10D5 更有效地捕获 A β 1-42。

[0288] 各种不同的抗体 (包括 12A11) 捕获可溶性 A β 的能力进一步分析如下。各种不

同浓度（高达 $10 \mu\text{g/ml}$ ）的抗体与 50,000CPM 的 ^{125}I -A β 1-42（或 ^{125}I -A β 1-40）温育。在捕获放射性免疫测定中确定足以结合 25% 的放射性计数的抗体浓度。对浓度 $10 \mu\text{g/ml}$ 时不能结合 25% 的计数的抗体，确定浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$ 时结合的计数百分比。12A11 在浓度 $10 \mu\text{g/ml}$ 时结合 20% 的放射性计数（即， ^{125}I -A β ）。该值大于通过其他两个测试的 A β 3-7 抗体，即 12B4 和 10D5 结合的量（浓度 $10 \mu\text{g/ml}$ 时分别结合 7% 和 2%）。因此，在测试的 N-端（表位 A β 3-7）抗体，12A11 显示出最明显捕获 A β 的能力。

[0289] 作为能够触发 Fc-介导的斑清除的措施，抗体也在离体吞噬作用分析中与来自 PDAPP 小鼠的初级小鼠小神经胶质细胞和脑组织切片比较。不相关的 IgG1 和 IgG2a 抗体对 A β 或其他分析组分没有反应性，用作同种型匹配的阴性对照。简而言之，鼠初级小神经胶质细胞在抗体存在下与 PDAPP 小鼠脑的未固定的低温切片培养。24 小时温育后，培养物中剩余 A β 的总水平通过 ELISA 测量。为了定量斑清除 / A β 降解的程度，以 8M 尿素从小神经胶质细胞培养物和脑切片（ $n = 3$ ）提取 A β 用于 ELISA 分析。数据分析采用 ANOVA，接着采用 post hoc Dunnett 氏测试。

[0290] 如图 1 所示，12B4 抗体有效减轻 A β 水平（对 12B4 为 73%； $P < 0.001$ ），12A11 显示有点小，尽管统计学上显著的功效（对 12A11 为 48%， $P < 0.05$ ）。10D5 抗体不显著减少 A β 水平。12A11 在离体吞噬作用分析中的性能在转化成对小神经胶质吞噬作用是优选的同种型的 IgG2a 同种型后可得以改进。

[0291] 实施例 II. 小鼠 12A11 抗体的体内功效

[0292] 小鼠抗体 12A11 体内减轻茨海默氏样神经病理学

[0293] 为了确定 12A11 的体内功效，抗体（包括 12A11，12B4，或 10D5）以 1mg/kg 每周腹腔内注射给药至小鼠，历时 6 个月，如 Bard 等（2000）Nat. Med. 6 :916 中所述。研究结束时，皮质 A β 的总水平通过 ELISA 确定。如图 2A 所示，与 PBS 对照比较，各抗体显著减少总 A β 水平（ $P < 0.001$ ），即 12B4 显示 69% 减少，10D5 显示 52% 减少，以及 12A11 显示 31% 减少。

[0294] 然后，检查上述小鼠脑组织切片中的神经性营养不良的水平，以确定斑清除和神经元保护之间的联系。脑图像分析数据检查被神经性营养不良占据的前皮质的百分比示于图 2B 中。这些数据显示抗体 10D5 和 12A11 对减轻神经性营养不良是无效的，而 12B4 显著减轻神经性营养不良（12B4， $P < 0.05$ ；ANOVA，接着 post hoc Dunnett 氏测试），正如由在此所述的分析确定。再者，这种 12A11 的活性通过转化 12A11 成 IgG2a 同种型（鼠功效）得以改进。关于 12A11 的人源化版本，IgG1 同种型对减轻神经性营养不良是优选的。

[0295] 证明抗体 12A11 的结合属性和体内功效的实验也描述在 Bard 等 PNAS 100 : 2023(2003) 中，在此引作参考。

[0296] 总之，所有抗体对聚集的 A β 具有显著的亲合力，并在离体分析中触发斑清除。IgG2a 同种型（对 Fc 受体，尤其 Fc γ RI 的亲合性）似乎为清除 A β 和免遭神经性营养不良的重要特征。抗体 12A11(IgG1) 比 12B4(IgG2a) 或 10D5(IgG1) 更有效地捕获可溶性单体 A β 1-42，但对减轻神经性营养不良不是一样有效。通过改造抗体具有最大支持吞噬作用的同种型，可实现减轻斑负荷和减轻神经性营养不良的增强功效。特别灵敏的抗体结合至 A β 的 N 端内的表位。

[0297] 实施例 III. 小鼠 12A11 可变区的克隆和测序

[0298] 12A11 VH 的克隆和序列分析。使用来自杂交瘤细胞的 mRNA 和标准的克隆方法,通过 RT-PCR 和 5' RACE 对来自杂交瘤细胞的 12A11VH 和 VL 区进行了克隆。来自编码推测的 12A11 VH 结构域的独立的 cDNA 克隆的核苷酸序列(编码序列,SEQ ID NO:3)和推导的氨基酸序列(SEQ ID NO:4)分别被显示在表 3 和表 4 中。

[0299] 表 3:小鼠 12A11 VH DNA 序列

[0300] ATGGACAGGCTTACTACTTCATTCTGCTGCTGATTGTCCCTGCATATGTCTTGTCCCAAGTTACTCTAAAGAGTCTGGCCCTGGGATATTGAAGCCCTCACAGACCCTCAGTCTGACTTGTCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAGCACTTCTGGTATGAGTGTAGGCTGGATTTCGTACGCCCTCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTGGTGGGATGATGATAAGTACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAGAAACCAGGTATTCCTCAAGATCACCAGTGTGGACACTGCAGATACTGCCACTTACTACTGTGCTCGAAGAACTACTACGGCTGACTACTTGCCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCA(SEQ ID NO:3)

[0301] 表 4:小鼠 12A11 VH 氨基酸序列

[0302] mdrllttsfllllivpayvlsQVTLKESGPGILKPSQTLSTCSFSGFSLStsgmsvgWIRQPSGKGLEWL AhiwwdddkyynpslksRLTISKDTSRNQVFLKITSVDTADTATYYCARrtttadyfayWGQGTTTLTVSS(SEQ ID NO:4)

[0303] *小写字母表示前导肽和 CDRs。

[0304] 12A11 VL 的克隆和序列分析。以与 VH 区类似的方式对 12A11 的轻链可变区 VL 区进行了克隆。来自两个编码推测的 12A11 VL 结构域的独立的 cDNA 克隆的核苷酸序列(编码序列,SEQ ID NO:1)和推导的氨基酸序列(SEQ ID NO:2)分别被显示在表 5 和表 6 中。

[0305] 表 5:小鼠 12A11 VL DNA 序列

[0306] ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGTGATGTTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTGATGTTTTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGACAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTACTTAGAATG GTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACA AAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAAGTTCACATGTTCTCTCACGTTGGTGTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA(SEQ IDNO:1)

[0307] 表 6:小鼠 12A11 VL 氨基酸序列

[0308] mklpvrlvlmfwipasssDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCrssqsivhsngntyleWYLQKPGQSPKLLIYkvsnrfsGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDLGIYYCfqsshvplTFGAGTKLELK(SEQ ID NO:2)

[0309] *小写字母表示前导肽和 CDRs。

[0310] 12A11 的 VL 和 VH 序列满足功能性 V 区的标准,只要它们含有从起始的甲硫氨酸到 C 区的连续 ORF,并且享有免疫球蛋白 V 区基因的保守的残基特征。从 N-末端到 C-末端,轻链和重链都含有 FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4 结构域。

[0311] 实施例 IV:嵌合 12A11 抗体的表达

[0312] 嵌合的 12A11 抗体的表达:重链和轻链可变区被重新改造以编码分别位于 VDJ 或 VJ 结合区下游的拼接供体序列,并将重链克隆到哺乳动物表达载体 pCMV-h γ 1 中,轻链克隆到 pCMV-h κ 1 中。这些载体以位于插入的可变区盒下游的外显子片段编码人 γ 1 和 κ 1 恒定区。在证实了序列后,重链和轻链表达载体被共转染到 COS 细胞中。各种不同的重链克隆独立地与不同的嵌合轻链克隆共转染,以证实结果的再现性。利用蛋白 A Sepharose 从

COS 细胞条件培养基中免疫沉淀抗体。在 SDS-PAGE 凝胶上通过免疫印迹检测抗体链。利用山羊 - 抗 - 人 - IgG (H+L) 抗体以 1 : 5000 稀释室温下检测 1 小时。显著量的 12A11 H+L 链在条件培养基中进行检测。

[0313] 嵌合的 12A11 抗体与 A β 的直接结合通过 ELISA 分析测试。图 4 显示了嵌合的 12A11 被发现能够以高的亲合力与 A β 结合, 类似于嵌合的和人源化的 3D6。(3D6 的克隆、表征和人源化被描述在美国专利申请系列号 10/010942 中, 在此以其全文引为参考)。嵌合的和人源化的 12B4 也显示出同样的结合亲合力。(12B4 的克隆、表征和人源化被描述在美国专利申请系列号 10/388, 214 中, 在此以其全文引为参考)。

[0314] 实施例 V. 12A11 人源化

[0315] A. 12A11 人源化抗体, 版本 1

[0316] 同源性 / 分子模型分析。为了鉴定鼠 12A11 抗体中的关键结构框架残基, 对与 12A11 重链和轻链具有同源性的解析的鼠抗体的三维模型进行研究。选择与 12A11 轻链具有相近同源性的命名为 1KTR 的抗体, 以及选择与 12A11 重链具有相近同源性的命名为 1ETZ 和 1JRH 的两种抗体。这些小鼠抗体显示与 12A11 有高的序列保守性 (对 Vk 而言, 在 112 个氨基酸中有 94% 同一性, 以及对 Vh 而言, 分别在 126 个氨基酸中有 83% 同一性和在 121 个氨基酸中有 86% 同一性)。1ETZ 的重链结构添加在 1KTR 之上。此外, 对 Vk 而言, 选择抗体的 CDR 环落入与 12A11 VL 的 CDR 环相同的经典 Chothia 结构类型。检查这些抗体的晶体结构的残基 (例如, 对 CDR 构象重要的 FR 残基等), 这些残基预测对抗体的功能, 以及通过比较, 对类似 12A11 抗体的功能是至关重要的。

[0317] 人受体抗体序列的选择。合适的人受体抗体序列是通过将小鼠可变区的氨基酸序列与已知人抗体的序列进行计算机比较而鉴定出来的。12A11 重链和轻链的比较分别进行。具体来说, 其框架序列与鼠 VL 和 VH 框架区表现出高度序列同一性的人抗体的可变结构域是利用 NCBI BLAST (可以通过国立卫生研究院 NCBI 互联网服务器公开进入) 和各自的鼠框架序列通过查询 NCBI Ig 数据库而鉴定的。

[0318] 基于下列标准选择了两个候选序列作为受体序列: (1) 与对象序列 的同源性; (2) 与供体序列共有典型的 CDR 结构; 和 / 或 (3) 在框架区不含任何稀有的氨基酸残基。为 VL 选择的受体序列是 NCBI Ig 非多余数据库中的 BAC01733。而为 VH 选择的受体序列是 NCBI Ig 非多余数据库中的 AAA69734。AAA69734 是人类亚群 III 抗体 (而非亚群 II), 但被选作起始受体抗体, 至少部分基于 Saldanha 等 (1999) Mol. Immunol. 36 :709 中的理由。第一版人源化 12A11 抗体利用这些选择的受体抗体序列。抗体描述在 Schroeder 和 Wang (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 :6146 中。

[0319] 氨基酸残基的取代。如上所述, 本发明的人源化抗体含有基本上来自人免疫球蛋白 (受体免疫球蛋白) 的可变框架区和基本上来自名为 12A11 的小鼠免疫球蛋白 (供体免疫球蛋白) 的互补决定区。在鉴定了 12A11 的互补决定区和适当的人受体免疫球蛋白后, 下一步是确定这些组分中的哪个残基, 如果有的话, 被取代以最适化获得的人源化抗体的性质。

[0320] 重构的轻链可变区:

[0321] 重构的轻链可变区的氨基酸比对显示在图 5A 中。受体框架 (BAC01733) 是从与鼠可变区相应的同样的人亚群中选择出来的, 没有不寻常的框架残基, 并且 CDRs 属于同样的

Chothia 典型结构组。人源化 12A11 版本 1 没有回复突变。

[0322] 重构的重链可变区：

[0323] 重构的重链可变区的氨基酸比对显示在图 5B 中。受体框架 (AAA69734) 是从人亚群 III (如前所述) 中选择出来的, 没有不寻常的框架残基。鼠 VH 链 (1ETZ 和 1JRH) 的结构分析, 连同 AAA69734 与鼠序列的氨基酸比对, 显示在版本 1 (v1) 重构的重链中的 9 个回复突变 :A24F T28S F29L V37I V48L F67L R71K N73T L78V (Kabat 编号)。在图 5B 显示的氨基酸比对中回复突变用星号着重注明。

[0324] 在 9 个回复突变中有 3 个由模型指定, 因为这些残基是典型的残基 (A24F、F29L 和 R71K, 以实心填充), 即由于邻近 CDR 残基可能对抗原结合有贡献的框架残基。在第二重要的残基类型, 参与 VH-VL 装配相互作用的界面残基 (下划线) 中有一个回复突变, 即 V37I。N73T 突变是位于结合位点边缘上的微调残基 (以点填充), 可能与邻近 CDR1 的 S30 相互作用。剩余的 4 个被回复突变靶向的残基 (T28S、V48L、F67L 和 L78V, Kabat 编号) 也都落入微调类型中 (对 CDR 构象没有直接的贡献, 5B 中以点填充)。

[0325] 掺入人源化 12A11 版本 1 中的变化概述示于表 7 中。

[0326] 表 7. 人源化 12A11. v1 中变化的概述

[0327]

变化	VL (112 个残基)	VH (120 个残基)
人 > 小鼠 : 框架	0/112	9/120
CDR1	5/16	6/7
CDR2	3/7	10/16
CDR3	6/8	8/11
总的人 > 小鼠	14/112 (12.5%)	33/120 (27.5%)
小鼠 > 人 : 框架	11/112	26/120
回复突变备注	无	1. 经典 : A24F, F29L, R71K 2. 装配 : V37I 3. 微调 : T28S, V48L, F67L, N73T, L78V
受体备注	4. Genbank 登录号 BAC01733 5. 来自与供体小鼠相同的经典结构组的 CDRs ; 6. 免疫球蛋白 κ 轻链 K64 (AIMS4)	7. Genbank 登录号 AAA69734 (H1 = 类 1, H2 = 类 3) 8. 来自与供体小鼠相同的经典结构组的 CDRs 9. 胎儿 Ig

[0328] 表 8 和 9 分别显示了各种不同的轻链和重链的 Kabat 编号的要点。

[0329] 表 8 : 12A11 轻链的 Kabat 编号的要点

		小鼠		人		A19- 种系	
		12A11		12A11		BAC	
[0331]	KAB#						
[0332]	#	类型	VL	VL	01733	注释	
[0333]	1	1	FR1	D	D	D	D
[0334]	2	2		V	V	V	I 经典
[0335]	3	3		L	V	V	V
[0336]	4	4		M	M	M	M 微调
[0337]	5	5		T	T	T	T
[0338]	6	6		Q	Q	Q	Q
[0339]	7	7		T	S	S	S
[0340]	8	8		P	P	P	P
[0341]	9	9		L	L	L	L

[0342]	10	10		S	S	S	S	
[0343]	11	11		L	L	L	L	
[0344]	12	12		P	P	P	P	
[0345]	13	13		V	V	V	V	
[0346]	14	14		S	T	T	T	
[0347]	15	15		L	P	P	P	
[0348]	16	16		G	G	G	G	
[0349]	17	17		D	E	E	E	
[0350]	18	18		Q	P	P	P	
[0351]	19	19		A	A	A	A	
[0352]	20	20		S	S	S	S	
[0353]	21	21		I	I	I	I	
[0354]	22	22		S	S	S	S	
[0355]	23	23		C	C	C	C	
[0356]	24	24	CDR1	R	R	R	R	
[0357]	25	25		S	S	S	S	
[0358]	26	26		S	S	S	S	
[0359]	27	27		Q	Q	Q	Q	
[0360]	27A	28		S	S	S	S	
[0361]	27B	29		I	I	L	L	
[0362]	27C	30		V	V	L	L	
[0363]	27D	31		H	H	H	H	
[0364]	27E	32		S	S	S	S	
[0365]	28	33		N	N	N	N	
[0366]	29	34		G	G	G	G	
[0367]	30	35		N	N	Y	Y	
[0368]	31	36		T	T	N	N	
[0369]	32	37		Y	Y	Y	Y	
[0370]	33	38		L	L	L	L	
[0371]	34	39		E	E	D	D	
[0372]	35	40	FR2	W	W	W	W	
[0373]	36	41		Y	Y	Y	Y	装配
[0374]	37	42		L	L	L	L	
[0375]	38	43		Q	Q	Q	Q	装配
[0376]	39	44		K	K	K	K	
[0377]	40	45		P	P	P	P	微调
[0378]	41	46		G	G	G	G	
[0379]	42	47		Q	Q	Q	Q	
[0380]	43	48		S	S	S	S	

[0381]	44	49		P	P	P	P	装配
[0382]	45	50		K	Q	Q	Q	
[0383]	46	51		L	L	L	L	装配
[0384]	47	52		L	L	L	L	微调
[0385]	48	53		I	I	I	I	经典
[0386]	49	54		Y	Y	Y	Y	微调
[0387]	50	55	CDR2	K	K	L	L	
[0388]	51	56		V	V	G	G	
[0389]	52	57		S	S	S	S	
[0390]	53	58		N	N	N	N	
[0391]	54	59		R	R	R	R	
[0392]	55	60		F	F	A	A	
[0393]	56	61		S	S	S	S	
[0394]	57	62	FR3	G	G	G	G	
[0395]	58	63		V	V	V	V	
[0396]	59	64		P	P	P	P	
[0397]	60	65		D	D	D	D	
[0398]	61	66		R	R	R	R	
[0399]	62	67		F	F	F	F	
[0400]	63	68		S	S	S	S	
[0401]	64	69		G	G	G	G	经典
[0402]	65	70		S	S	S	S	
[0403]	66	71		G	G	G	G	微调
[0404]	67	72		S	S	S	S	
[0405]	68	73		G	G	G	G	微调
[0406]	69	74		T	T	T	T	微调
[0407]	70	75		D	D	D	D	
[0408]	71	76		F	F	F	F	经典
[0409]	72	77		T	T	T	T	
[0410]	73	78		L	L	L	L	
[0411]	74	79		K	K	K	K	
[0412]	75	80		I	I	I	I	
[0413]	76	81		S	S	S	S	
[0414]	77	82		R	R	R	R	
[0415]	78	83		V	V	V	V	
[0416]	79	84		E	E	E	E	
[0417]	80	85		A	A	A	A	
[0418]	81	86		E	E	E	E	
[0419]	82	87		D	D	D	D	

[0420]	83	88		L	V	V	V	
[0421]	84	89		G	G	G	G	
[0422]	85	90		I	V	V	V	
[0423]	86	91		Y	Y	Y	Y	
[0424]	87	92		Y	Y	Y	Y	装配
[0425]	88	93		C	C	C	C	
[0426]	89	94	CDR3	F	F	M	M	
[0427]	90	95		Q	Q	Q	Q	
[0428]	91	96		S	S	A	A	
[0429]	92	97		S	S	L	L	
[0430]	93	98		H	H	Q	Q	
[0431]	94	99		V	V	T	T	
[0432]	95	100		P	P	P	P	
[0433]	96	101		L	L	Y		
[0434]	97	102		T	T	T		
[0435]	98	103	FR4	F	F	F		装配
[0436]	99	104		G	G	G		
[0437]	100	105		A	Q	Q		
[0438]	101	106		G	G	G		
[0439]	102	107		T	T	T		
[0440]	103	108		K	K	K		
[0441]	104	109		L	L	L		
[0442]	105	110		E	E	E		
[0443]	106	111		L	I	I		
[0444]	106A	112		K	K	K		

[0445] 表 9 :12A11 重链的 Kabat 编号的要点

[0446]				小鼠	人	567123	
[0447]	<u>KAB#</u>	<u>类型</u>	<u>12A11</u>	<u>12A11</u>	<u>AAA</u>	<u>种系</u>	
[0448]	<u>#</u>	<u>VH</u>	<u>VHv1</u>	<u>69734</u>		<u>注释</u>	
[0449]	1	1 FR1	Q	Q	Q	Q	
[0450]	2	2	V	V	V	V	微调
[0451]	3	3	T	Q	Q	Q	
[0452]	4	4	L	L	L	L	
[0453]	5	5	K	V	V	V	
[0454]	6	6	E	E	E	E	
[0455]	7	7	S	S	S	S	
[0456]	8	8	G	G	G	G	
[0457]	9	9	P	G	G	G	
[0458]	10	10	G	G	G	G	

[0459]	11	11	I	V	V	V	
[0460]	12	12	L	V	V	V	
[0461]	13	13	K	Q	Q	Q	
[0462]	14	14	P	P	P	P	
[0463]	15	15	S	G	G	G	
[0464]	16	16	Q	R	R	R	
[0465]	17	17	T	S	S	S	
[0466]	18	18	L	L	L	L	
[0467]	19	19	S	R	R	R	
[0468]	20	20	L	L	L	L	
[0469]	21	21	T	S	S	S	
[0470]	22	22	C	C	C	C	
[0471]	23	23	S	A	A	A	
[0472]	24	24	F	F	A	A	在 v1 中回复突变 - 对 H1
[0473]							是经典的
[0474]	25	25	S	S	S	S	
[0475]	26	26	G	G	G	G	经典
[0476]	27	27	F	F	F	F	经典
[0477]	28	28	S	S	T	T	微调, 接近 H1- 在 v1
[0478]							中回复突变
[0479]	29	29	L	L	F	F	对 H1 是经典的 - 在 v1
[0480]							中回复突变
[0481]	30	30	S	S	S	S	
[0482]	31	31	CDR1	T	T	S	S
[0483]	32	32		S	S	Y	Y
[0484]	33	33		G	G	A	A
[0485]	34	34		M	M	M	M
[0486]	35	35		S	S	H	H
[0487]	35A	36		V	V	-	-
[0488]	35B	37		G	G	-	-
[0489]	36	38	FR2	W	W	W	W
[0490]	37	39		I	I	V	V
[0491]	38	40		R	R	R	R
[0492]	39	41		Q	Q	Q	Q
[0493]	40	42		P	A	A	A
[0494]	41	43		S	P	P	P
[0495]	42	44		G	G	G	G
[0496]	43	45		K	K	K	K
[0497]	44	46		G	G	G	G

装配 - 在 v1 中回复突变

装配

[0498]	45	47		L	L	L	L	装配
[0499]	46	48		E	E	E	E	
[0500]	47	49		W	W	W	W	装配
[0501]	48	50		L	L	V	V	微调 (在 H2 之下)- 在 v1
[0502]								中回复突变
[0503]	49	51		A	A	A	A	
[0504]	50	52	CDR2	H	H	V	V	
[0505]	51	53		I	I	I	I	
[0506]	52	54		W	W	S	S	
[0507]	53	55		W	W	Y	Y	
[0508]	54	56		D	D	D	D	
[0509]	55	57		D	D	G	G	
[0510]				-	-	S	S	
[0511]	56	58		D	D	N	N	
[0512]	57	59		K	K	K	K	
[0513]	58	60		Y	Y	Y	Y	
[0514]	59	61		Y	Y	Y	Y	
[0515]	60	62		N	N	A	A	
[0516]	61	63		P	P	D	D	
[0517]	62	64		S	S	S	S	
[0518]	63	65		L	L	V	V	
[0519]	64	66		K	K	K	K	
[0520]	65	67		S	S	G	G	
[0521]	66	68	FR3	R	R	R	R	
[0522]	67	69		L	L	F	F	微调 (在 H2 之下,可能
[0523]								与 L63 相互作用)- 在 v1
[0524]								中回复突变
[0525]	68	70		T	T	T	T	
[0526]	69	71		I	I	I	I	
[0527]	70	72		S	S	S	S	
[0528]	71	73		K	K	R	R	对 H2 是经典的 - 在 v1
[0529]								中回复突变
[0530]	72	74		D	D	D	D	
[0531]	73	75		T	T	N	N	微调 (结合位点的边缘,
[0532]								可与 S30 相互作用)- 在
[0533]								v1 中回复突变
[0534]	74	76		S	S	S	S	
[0535]	75	77		R	K	K	K	
[0536]	76	78		N	N	N	N	

[0537]	77	79		Q	T	T	T	
[0538]	78	80		V	V	L	L	微调（隐藏在 H1 之下，
[0539]								可能与 V35A 相互作用）
[0540]								- 在 v1 中回复突变
[0541]	79	81		F	Y	Y	Y	
[0542]	80	82		L	L	L	L	
[0543]	81	83		K	Q	Q	Q	
[0544]	82	84		I	M	M	M	
[0545]	82A	85		T	N	N	N	
[0546]	82B	86		S	S	S	S	
[0547]	82C	87		V	L	L	L	
[0548]	83	88		D	R	R	R	
[0549]	84	89		T	A	A	A	
[0550]	85	90		A	E	E	E	
[0551]	86	91		D	D	D	D	
[0552]	87	92		T	T	T	T	
[0553]	88	93		A	A	A	A	
[0554]	89	94		T	V	V	V	
[0555]	90	95		Y	Y	Y	Y	
[0556]	91	96		Y	Y	Y	Y	装配
[0557]	92	97		C	C	C	C	
[0558]	93	98		A	A	A	A	装配
[0559]	94	99		R	R	R	R	经典
[0560]				-	-	D	D	
[0561]	95	100	CDR3	R	R	R	-	
[0562]	96	101		T	T	H	-	
[0563]	97	102		T	T	S	-	
[0564]	98	103		T	T	S	-	
[0565]	99	104		A	A	S	A	
[0566]	100	105		D	D	W	K	
[0567]	100A	106		Y	Y	Y	L	
[0568]	100B	107		F	F	Y	L	
[0569]	101	108		A	A	G	M	
[0570]	102	109		Y	Y	M	L	
[0571]				-	-	D	L	
[0572]				-	-	V	I	
[0573]	103	110		W	W	W	S	装配
[0574]	104	111		G	G	G	G	
[0575]	105	112		Q	Q	Q	A	

[0576]	106	113	G	G	G	K
[0577]	107	114 FR4	T	T	T	G
[0578]	108	115	T	T	T	Q
[0579]	109	116	L	V	V	W
[0580]	110	117	T	T	T	S
[0581]	111	118	V	V	V	P
[0582]	112	119	S	S	S	S
[0583]	113	120	S	S	S	L

[0584] 人源化抗体优选表现出与 A β 的特异性结合亲和性为至少 10^7 、 10^8 、 10^9 或 $10^{10}M^{-1}$ 。通常人源化抗体与 A β 的结合亲和性的上限在 12A11 的结合亲和性（即大约 10^9M^{-1} ）的 3、4、或 5 倍的范围内。结合亲和性的下限通常也在 12A11 的结合亲和性的 3、4、或 5 倍的范围内。

[0585] 第一版人源化 12A11VH 和 VL 的组装和表达

[0586] 利用适当的寡核苷酸引物，PCR- 介导的组装用于生成 h12A11v1。人源化 12A11VL（版本 1）（SEQ ID NO :34）和 12A11VH（版本 1）（SEQ IDNO :35）的核苷酸序列分别示于下表 10 和 11 中。

[0587] 表 10. 人源化 12A11VLv1 的核苷酸序列

[0588] atgaggctccctgctcagctcct ggggctgctgatgctctgggtctctgggtccagtgggGATGTTGT
GATGACCCAATCTCCACTCTCCCTGCCTGTCCTGGAGAGCCAGCCTCCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCA
TTGTGCATAGTAATGGAAACACCTACCTG GAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTA
CAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGA
TCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAAGTTCACATGTTTCCTCTCACCTTCGGTCAG
GGGACCAAGCTGGAGATCAAA（SEQID NO :34）

[0589] （大写字母仅表示 VL 区段）由 A19 种系序列编码的前导肽，衍生自 x63397 前导肽。

[0590] 表 11. 人源化 12A11VHv1 的核苷酸序列

[0591] atggagtttgggctgagctgggttttccctcggttgccttctgagaggtgtccagtgtCAAGTTCAGCTG
GTGGAGTCTGGCGCGGGGTGGTGCAGCCCGACGGTCCCTCAGGCTGTCTTGTGCTTTCTCTGGGTTTTCACTGAG
CACTTCTGGTATGAGTGTGGGCTGGATTTCGTCAGGCTCCAGGGAAGGGTCTGGAGTGGCTGGCACACATTTGGTGGG
ATGATGATAAGTACTATAACCCATCCCTGAAGAGCCGGCTCACAATCTCCAAGGATACCTCCAAAAACACCGTGTAC
CTCCAGATGAACAGTCTGCGGGCTGAAGATACTGCCGTGTACTACTGTGCTCGAAGAATACTACTACCGCTGACTACTT
TGCCTACTGGGGCCAAGGCACCACTGTCACAGTCTCCTCA（SEQ IDNO :35）

[0592] 衍生自 VH 供体序列登录号 M34030. 1/aaa69734/M72 的前导肽（小写字母）

[0593] 人源化 12A11VL（版本 1）的氨基酸序列（SEQ ID NO :7）和 12A11VH（版本 1）的氨基酸序列（SEQ ID NO :10）分别示于图 5A 和 5B。

[0594] B. 人源化 12A11 抗体 - 版本 2, 2.1 和 3

[0595] 微调残基（例如，S28T，L48V，L67F，V78L）间接贡献于 CDR 构象，并被假定对构象混乱意义最小。利用 Strategene 的试剂盒以及 pCRS 质粒中的 h12A11VHv1 作为突变模板，靶向残基被定点突变以在对应于版本 2 的克隆处出现。将测序验证的版本 2V- 区插入物亚

克隆至重链表达载体 pCMV-C γ 1 的 BamHI/HindIII 位点以产生重组 h12A11v2 抗体。同样创建的版本 2.1 抗体,除 T73N 位置的突变之外具有上述各个微调残基突变(即,消除回复突变)。版本 3 抗体除 K71R 位置的突变之外同样具有上述各个突变 S28T, L48V, L67F, V78L。

[0596] C. 人源化 12A11 抗体 - 版本 4-6

[0597] 设计的其他人源化 12A11 版本保留经典和装配残基的回复突变,但消除 1 个(版本 4.1-4.4),两个(版本 5.1-5.6)或三个(版本 6.1-6.4)微调残基的回复突变。如上部分 B 中所述,进行定点突变和克隆构建。重组抗体表达在 COS 细胞中,并纯化自 COS 细胞上清液。其他版本可包括上述组合,例如,1,2,3,4 或 5 个微调残基的人残基与至少 1 个装配和/或经典残基(例如,位置 28,37,48,67,71 和 78 的人残基,或位置 28,37,48,67,71,73 和 78 的人残基)组合。

[0598] D. 人源化 12A11 抗体 - 版本 7 和 8

[0599] 创建的第 7 版人源化 12A11 具有版本 1 所示的各个回复突变,除残基 28(微调)的 T $\rightarrow$ S 回复突变以及残基 37(装配)的 V $\rightarrow$ I 回复突变之外。创建的第 8 版人源化 12A11 具有版本 1 所示的各个回复突变,除残基 73(微调)的 N $\rightarrow$ T 回复突变之外。第 7 和 8 版人源化 12A11 重链的氨基酸序列分别如 SEQ ID NOs:30 和 31 所示。

[0600] 与第 1 版比较,第 7 版仅含有 7 个回复突变。T28S 回复突变是保守性的,并在第 7 版的重链中消除。装配残基 V37I 的回复突变也在第 7 版中消除。与第 1 版比较,第 8 版仅含有 8 个回复突变。在第 8 版中, N73T(微调)回复突变被消除。

[0601] 其他版本可包括上述组合,例如,选自位置 28,48,78 和 73 的 1,2,3,4(或 5)个残基的人残基(例如,消除回复突变),任选与消除至少 1 个装配残基(例如,位置 37)和/或至少 1 个经典残基的回复突变组合。

[0602] 实施例 VI:人源化 12A11 抗体的功能测试

[0603] 人源化 12A11 版本 1 的克隆如实施例 V 中所示。人源化 12A11 通过在 COS 细胞中瞬时表达生产,并根据公知方法纯化。人源化抗体的结合活性首先由定性 ELISA 分析证明(数据未显示)。人源化 12A11 版本 1 再与其鼠和嵌合对应物比较两个属性:抗原结合(定量 A β ELISA)和相对亲和性。h12A11v1 的结合活性经定量 A β ELISA 证明,并发现与鼠和嵌合形式的 12A11 相同(参见图 7)。

[0604] 通过竞争性 A β ELISA, h12A11v1 抗体的亲和性也与鼠和嵌合 12A11 抗体比较。对竞争性结合测定而言,使用生物素结合的重组小鼠 12A11C γ 2a(同种型转换的 12A11)。生物素化的 m12A11C γ 2a 或聚集体 A β 1-42 的结合活性通过 ELISA 分析,利用链亲和素-HRP 作为报道分子而确认。利用 HRP 结合的山羊抗-小鼠 HRP 作为报道分子,通过两种同工型 12A11(C γ 1, C γ 2a)直接比较 A β 结合,证实生物素结合的重组 12A11C γ 2a 与原始 C γ 1 小鼠抗体是可比的。

[0605] 竞争结合研究采用固定浓度的生物素结合的 m12A11 C γ 2a,并且与系列浓度的测试抗体竞争,如图 8 所示。图 8 显示出 h12A11v1 竞争性分析的结果,将 h12A11v1 与嵌合和鼠形式比较。人源化 12A11v1 在 2X IC₅₀ 值内与其鼠和嵌合对应物竞争。该数据与利用 Biacore 技术的亲和性确定(数据未显示)相一致,这表明鼠 C γ 2a 和 h12A11v1 的 KD 值分别为 38nM 和 23nM。总之,该发现提示, h12A11v1 保留其原始鼠对应物的抗原结合属性和亲和性。

[0606] COS 细胞瞬时转染有不同组合的人源化 12A11VH 和 h12A11VLv1。转染后 72 小时收集条件培养基。条件培养基中来自转染 COS 细胞的抗体浓度通过定量人 IgG ELISA 确定。定量 Aβ (1-42) 聚集体结合测定确认, h12A11v2, v2.1 和 v3 的抗原结合与 h12A11v1 和与嵌合 12A11 是可比的。而且, 版本 5.1-5.6 和 6.1-6.3 在该结合分析中测试时显示相似的结合活性。版本 6.4 显示分析中活性有些丧失, 但活性在版本 2 中又显著恢复。

[0607] 利用 BIAcore 技术, 也比较了鼠 12A11 和 h12A11v1 的结合属性。当接触低 - 或高 - 密度固定的 Aβ 肽 (bio-DAE 肽) 时, 鼠 12A11 和 h12A11v1 显示相似的结合图谱。还进行了鼠 12A11 对 h12A11v1 的动力学分析。在这些研究中, BIAcore 技术用于测量可溶性抗体与固相结合的生物素化的 DAE 肽的结合。该肽固定至链亲和素生物传感器芯片上, 然后, 施加不同浓度的各个抗体, 重复三次, 以时间函数测量结合。利用应用到二价模型上的 BIAevaluation 软件对动力学数据进行分析。通过球形分析, 从传感图 (sensorgram) 的合适区计算表观解离 (k_d) 和结合 (k_a) 速率常数。从动力学速率常数计算 bio-DAE10 和抗体之间相互作用的亲和常数。从这些测量中衍生出表观解离 (k_d) 和结合 (k_a) 速率常数, 并用于计算相互作用的 K_D 值。表 12 包括由 BIAcore 分析确定的 12A11 抗体的 Aβ 结合的动力学分析的概述。

[0608] 表 12 :

[0609]

二价模型(球形分析)					
抗体	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KA (1/M)	KD (nM)	Chi2
m12A11	1.05E+05	3.98E-03	2.64E+07	38.00	0.247
h12A11v1	1.47E+05	3.43E-03	4.29E+07	23.30	0.145

[0610] 数据显示, 与亲本鼠源 12A11 比较, 人源化 12A11 v1 对 Aβ 肽具有相似的亲和性。

[0611] 实施例 VII. 人类对象的预防和治疗

[0612] 进行了单剂的 I 期临床试验以确定在人中的安全性。治疗剂以增加的剂量给药不同的病人, 从大约为推测功效水平的 0.01 开始, 以 3 倍的倍数增加, 直至达到大约为小鼠有效剂量的 10 倍的水平。

[0613] 进行 II 期临床试验以确定治疗效果。使用阿茨海默氏病及相关的紊乱协会 (ADRDA) 对于可能的 AD 的判断标准所定义的患有早期到中期阿茨海默氏病的病人被选择。合适的病人在小精神状态测验 (MMSE) 中的得分在 12-26 的范围内。其它的选择标准是病人可能在研究期间保持存活以及没有复杂的情况例如相伴使用了可能有干扰作用的药物。病人功能的基线评估使用经典的心理测验来进行, 例如 MMSE 和 ADAS, 心理测验是一种综合的标度, 用于评估患有阿茨海默氏病的病人的状态和功能。这些心理测验标度为阿茨海默氏病症状的发展提供了一种度量。适当的定量生命标度也可以用来监测治疗。疾病的发展也可以通过 MRI 监测。病人的血液分布也可以被监测, 包括分析免疫原特异性抗体和 T 细胞反应。

[0614] 在基线测量后, 病人开始接受治疗。他们被随机地用治疗剂或安慰剂在不知情的情况下治疗。病人至少每 6 个月进行监测。功效通过治疗组相对于安慰剂组疾病发展的明显降低来确定。

[0615] 进行第二次 II 期临床试验以评估病人从非阿茨海默氏病早期记忆丧失,有时称为与年龄相关的记忆损伤 (AAMI) 或中度认知损伤 (MCI),到根据 ADRDA 标准定义为可能的阿茨海默氏病的转变。通过在参比人群中筛选记忆丧失的早期信号或与阿茨海默氏病前期症状相关的其它障碍、阿茨海默氏病家族史、遗传风险因素、年龄、性别以及其它被发现能预测阿茨海默氏病的高度风险的特征,从非临床人群中选择出有转变为阿茨海默氏病高度风险的病人。收集在适当的度量中得到的基线得分,这些度量包括 MMSE 和 ADAS 以及其它被设计用来评估更普通人群的度量。这些病人人群被分成适当的组,服用同样剂量的安慰剂与药剂以进行比较。这些病人人群被跟踪大约 6 个月,每个病人的终点是在观察结束时他或她是否转变成由 ADRDA 标准定义的可能的阿茨海默氏病。

[0616] 尽管上述的发明为了理解清晰之目的已经被详细地描述了,显然可以在附后的权利要求的范围内对它进行某些修改。所有本文引用的出版物和专利文件以及在图和序列列表中显示的文字,在此为所有目的以它们的全文引为参考,其程度如同对它们中每一个进行单独表示。

[0617] 从上文中显然可以看出本发明提供了许多用途。例如,本发明提供了使用任何上述的针对 A β 的抗体对生成淀粉样疾病进行治疗、预防或诊断,或生产用于这些目的的药物或诊断组合物。

[0001]

序列表

<110> 神经实验室有限公司 (Neuralab Limited)
惠氏公司 (Wyeth)

<120> 识别 β -淀粉样肽的人源化抗体
(HUMANIZED ANTIBODIES THAT RECOGNIZE BETA AMYLOID PEPTIDE)

<130> SCT055049-47

<150> 60/474654
<151> 2003-05-30

<160> 35

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 393
<212> DNA
<213> Murine

<220>

<221> CDS
<222> (1)...(393)

<220>

<221> sig_peptide
<222> (1)...(57)

<400> 1
atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
-15 -10 -5
tcc agc agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
1 5 10
agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att 144
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
15 20 25
gta cat agt aat gga aac acc tac tta gaa tgg tac ctg cag aaa cca 192
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
30 35 40 45
ggc cag tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac oga ttt tct 240
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
50 55 60
ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
65 70 75
ctc aag atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga att tat tac tgc 336
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys

[0002]

80	85	90	
ttt caa agt tca cat gtt cct ctc acg ttc ggt gct ggg acc aag ctg			384
Phe Gln Ser Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu			
95	100	105	

gag ctg aaa	393
Glu Leu Lys	
110	

<210> 2
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Murine

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)...(19)

<400> 2	
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala	
-15	-10
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val	
1	5
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile	
15	20
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	
30	35
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser	
50	55
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr	
65	70
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys	
80	85
Phe Gln Ser Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu	
95	100
Glu Leu Lys	
110	

<210> 3
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> Murine

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(417)

<220>
 <221> sig_peptide
 <222> (1)...(57)

<400> 3	
atg gac agg ctt act act tca ttc ctg ctg ctg att gtc cct gca tat	48
Met Asp Arg Leu Thr Thr Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr	
-15	-10

gtc ttg tcc caa gtt act cta aaa gag tct ggc cct ggg ata ttg aag	96
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys	

[0003]

1	5	10	
ccc tca cag acc ctc agt ctg act tgt tct ttc tct ggg ttt tca ctg			144
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu			
15	20	25	
agc act tct ggt atg agt gta ggc tgg att cgt cag cct tca ggg aag			192
Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys			
30	35	40	45
ggt ctg gag tgg ctg gca cac att tgg tgg gat gat gat aag tac tat			240
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr			
50	55	60	
aac cca tcc ctg aag agc cgg ctc aca atc tcc aag gat acc tcc aga			288
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg			
65	70	75	
aac cag gta ttc ctc aag atc acc agt gtg gac act gca gat act gcc			336
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala			
80	85	90	
act tac tac tgt gct cga aga act act acg gct gac tac ttt gcc tac			384
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr			
95	100	105	
tgg ggc caa ggc acc act ctc aca gtc tcc tca			417
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
110	115	120	
<210> 4			
<211> 139			
<212> PRT			
<213> Murine			
<220>			
<221> SIGNAL			
<222> (1)...(19)			
<400> 4			
Met Asp Arg Leu Thr Thr Ser Phe Leu Leu Leu Ile Val Pro Ala Tyr			
-15	-10	-5	
Val Leu Ser Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Lys			
1	5	10	
Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu			
15	20	25	
Ser Thr Ser Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys			
30	35	40	45
Gly Leu Glu Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr			
50	55	60	
Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Arg			
65	70	75	
Asn Gln Val Phe Leu Lys Ile Thr Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala			
80	85	90	
Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr			
95	100	105	
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
110	115	120	

[0004]

<210> 5
 <211> 429
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 5
 cmgmaagctt gccgccacca tgaagttgcc tgtaggctg ttggtgctga tgttctggat 60
 tcttgcttcc agcagtgatg ttttgatgac ccaaactcca ctctccctgc ctgtcagctc 120
 tggagatcaa gctccatct cttgcagatc tagtcagagc attgtacata gtaatggaaa 180
 cacctactta gaatggtagc tgcagaaacc aggccagctc ccaaagctcc tgatctacaa 240
 agtttccaac cgattttctg ggggtccaga cagggttcagt ggcagtggat cagggacaga 300
 tttcacactc aagatcagca gagtggaggc tgaggatctg ggaatttatt actgctttca 360
 aagttcacat gttcctctca cgttcggtgc tgggaccaag ctggagctga aacgtgagtg 420
 gatcctmgr 429

<210> 6
 <211> 445
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic

<400> 6
 aagcttgccg ccaccatgga caggcttact acttcattcc tgctgctgat tgtccctgca 60
 tatgtcttgt cccaagttac tctaaaagag tctggccctg ggatattgaa gccctcacag 120
 accctcagtc tgacttggtc tttctctggg ttttactga gcacttctgg tatgagtgtg 180
 ggctggattc gtcagccttc agggaagggg ctggagtggc tggcacacat ttggtgggat 240
 gatgataagt actataacct atccctgaag agccggctca caatctccaa ggatacctcc 300
 agaaaccagg tattcctcaa gatcaccagt gtggacactg cagatactgc cacttactac 360
 tgtgctcgaa gaactactac ggctgactac tttgcctact ggggccaagg caccactctc 420
 acagtctcct caggtagtgat gatcc 445

<210> 7
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic h12A11v1 - VL region

<400> 7
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser
 85 90 95
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

[0005]

<210> 8
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)...(22)

<400> 8
 Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala
 -20 -15 -10
 Ala Gln Pro Ala Met Ala Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser
 -5 1 5 10
 Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 15 20 25
 Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu
 30 35 40
 Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn
 45 50 55
 Arg Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
 60 65 70
 Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
 75 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly
 95 100 105
 Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 110

<210> 9
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)...(20)

<400> 9
 Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 -20 -15 -10 -5
 Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 1 5 10
 Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 15 20 25
 Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys
 30 35 40
 Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala
 45 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 65 70 75
 Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
 80 85 90
 Cys Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro
 95 100

[0006]

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> h12A11v1 - VH region

<400> 10
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 11
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SIGNAL
 <222> (1)...(19)

<400> 11
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 -15 -10 -5
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 1 5 10
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 20 25
 Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 30 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 50 55 60
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 65 70 75
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Arg His Ser Ser Ser Trp Tyr Tyr Gly Met
 95 100 105
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120

[0007]

<210> 12
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> SIGNAL

<222> (1)...(19)

<400> 12
 Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
 -15 -10 -5
 Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
 1 5 10
 Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 20 25
 Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 30 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala
 50 55 60
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
 65 70 75
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Ala Lys Leu Leu Met Leu Leu Ile Ser Gly
 95 100 105
 Ala Lys Gly Gln Trp Ser Pro Ser Leu
 110 115

<210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic h12A11v2

<400> 13
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95

 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0008]

<210> 14
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic h12A11v2.1

<400> 14
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 15
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic h12A11v3

<400> 15
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

[0009]

<223> synthetic h12A11v4.1

<400> 16

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu	Ser	Thr	Ser
		20						25					30		
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
	35					40						45			
Trp	Leu	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50				55						60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val
65					70					75					80
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
			85						90					95	
Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
	115						120								

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic h12A11v4.2

<400> 17

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
		20						25					30		
Gly	Met	Ser	Val	Gly	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu
	35					40						45			
Trp	Val	Ala	His	Ile	Trp	Trp	Asp	Asp	Asp	Lys	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser
	50				55						60				
Leu	Lys	Ser	Arg	Leu	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Thr	Val
65					70					75					80
Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
			85						90					95	
Cys	Ala	Arg	Arg	Thr	Thr	Thr	Ala	Asp	Tyr	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
	115						120								

<210> 18

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic h12A11v4.3

<400> 18

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Phe	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Ser
		20						25					30		

[0010]

```

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35              40              45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50              55              60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
      65              70              75              80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85              90              95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100             105             110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115             120

```

<210> 19
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic h12A11v4.4

```

<400> 19
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
  1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
      20              25              30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35              40              45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50              55              60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
      65              70              75              80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85              90              95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100             105             110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115             120

```

<210> 20
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic h12A11v5.1

```

<400> 20
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
  1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
      20              25              30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35              40              45
Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50              55              60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
      65              70              75              80

```

[0011]

```

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85                      90                      95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100                      105                      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115                      120

```

```

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic h12A11v5.2

```

```

<400> 21
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
      20          25          30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35          40          45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50          55          60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
      65          70          75          80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85          90          95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115          120

```

```

<210> 22
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic h12A11v5.3

```

```

<400> 22
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
      20          25          30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35          40          45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50          55          60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
      65          70          75          80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85          90          95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Val

```

[0012]

115

120

<210> 23
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic h12A11v5.4

<400> 23
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Val
 115 120

<210> 24
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> synthetic h12A11v5.5

<400> 24
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
 20 25 30
 Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 35 40 45
 Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
 65 70 75 80
 Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 25
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0013]

<220>

<223> synthetic h12A11v5.6

<400> 25

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
      20           25           30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35           40           45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50           55           60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
      65           70           75           80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85           90           95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115          120

```

<210> 26

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic h12A116.1

<400> 26

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
      20           25           30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35           40           45
Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50           55           60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
      65           70           75           80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85           90           95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100          105          110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115          120

```

<210> 27

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> synthetic h12A11v6.2

<400> 27

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1           5           10           15

```

[0014]

```

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
      20      25      30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35      40      45
Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50      55      60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
      65      70      75      80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85      90      95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115      120

```

```

<210> 28
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic h12A11v6.3

```

```

<400> 28
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
  1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
      20      25      30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35      40      45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50      55      60
Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
      65      70      75      80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85      90      95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
      115      120

```

```

<210> 29
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic h12A11v6.4

```

```

<400> 29
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
  1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
      20      25      30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
      35      40      45
Trp Val Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
      50      55      60

```

[0015]

```

Leu Lys Ser Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu
65              70              75              80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
              85              90              95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
              100              105              110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
              115              120

```

```

<210> 30
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic h12A11v7

```

```

<400> 30
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Thr Leu Ser Thr Ser
              20              25              30
Gly Met Ser Val Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
              35              40              45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
              50              55              60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Thr Val
65              70              75              80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
              85              90              95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
              100              105              110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
              115              120

```

```

<210> 31
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

```

```

<220>
<223> synthetic h12A11v8

```

```

<400> 31
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1              5              10              15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
              20              25              30
Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
              35              40              45
Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
              50              55              60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Val
65              70              75              80
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
              85              90              95
Cys Ala Arg Arg Thr Thr Thr Ala Asp Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
              100              105              110

```

[0016]

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic igg hinge region

<400> 32
Leu Leu Gly Gly Pro
1 5

<210> 33
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> synthetic igg hinge region

<400> 33
Leu Glu Gly Gly Pro
1 5

<210> 34
<211> 396
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> humanized 12A11 v1 VL sequence

<220>
<221> sig_peptide
<222> (1)...(60)

<400> 34
atgaggctcc ctgctcagct cctggggctg ctgatgctct gggctctctgg ctccagtggg 60
gatgtttgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctccctggaga gccagcctcc 120
atctctttgca gatctagtca gagcattgtg catagtaatg gaaacaccta cctggaatgg 180
tacctgcaga aaccaggcca gtctccacag ctccctgatct acaaagtttc caaccgattt 240
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 300
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ttcaaagttc acatgttcct 360
ctcaccttcg gtcagggggac caagctggag atcaaaa 396

<210> 35
<211> 417
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> humanized 12A11 v1 NH sequence

[0017]

<220>

<221> sig_peptide

<222> (1)...(57)

<400> 35

```
atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttc tgagaggtgt ccagtgtcaa 60
gttcagctgg tggagtctgg cggcgggggtg gtgcagcccg gacggtcctt caggctgtct 120
tgtgctttct ctgggttttc actgagcact tctggtatga gtgtgggctg gattcgtcag 180
gctccagggg agggctctgga gtggctggca cacatttggg gggatgatga taagtactat 240
aaccatccc tgaagagccg gctcacaatc tccaaggata cctccaaaaa caccgtgtac 300
ctccagatga acagtctgcg ggctgaagat actgccgtgt actactgtgc tcgaagaact 360
actaccgctg actactttgc ctactggggc caaggcacca ctgtcacagt ctctca 417
```

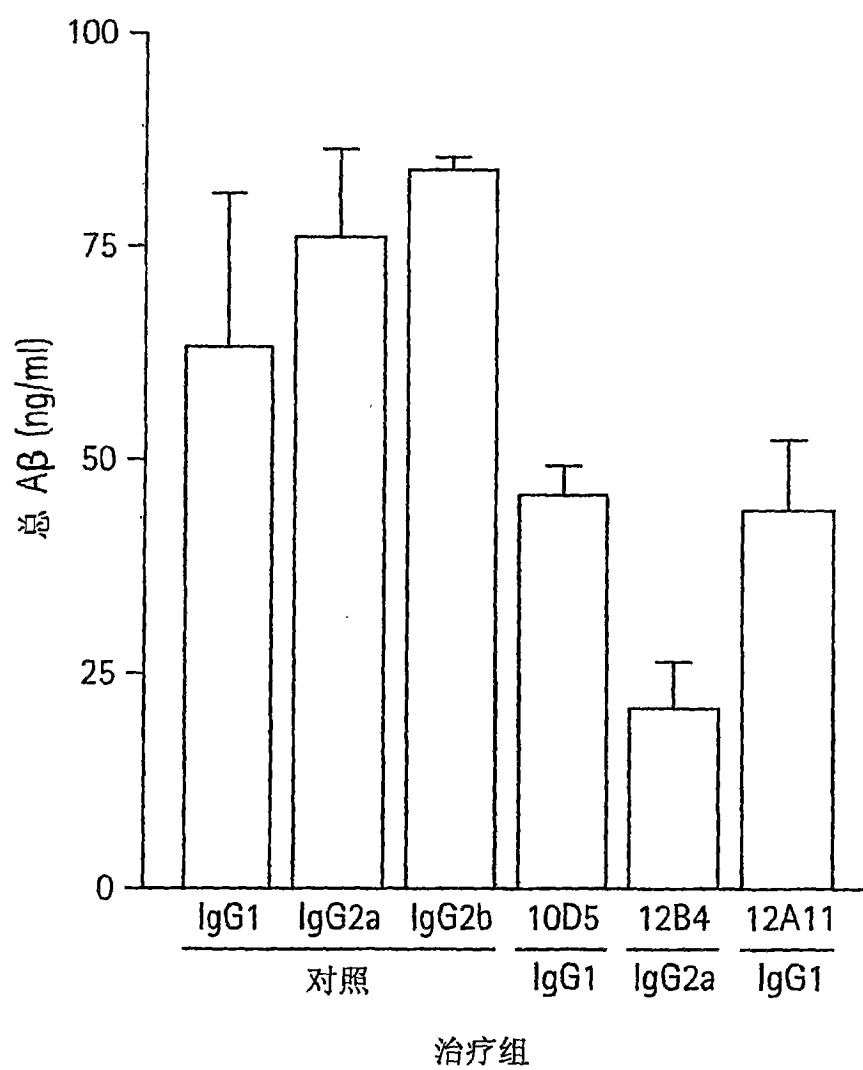


图 1

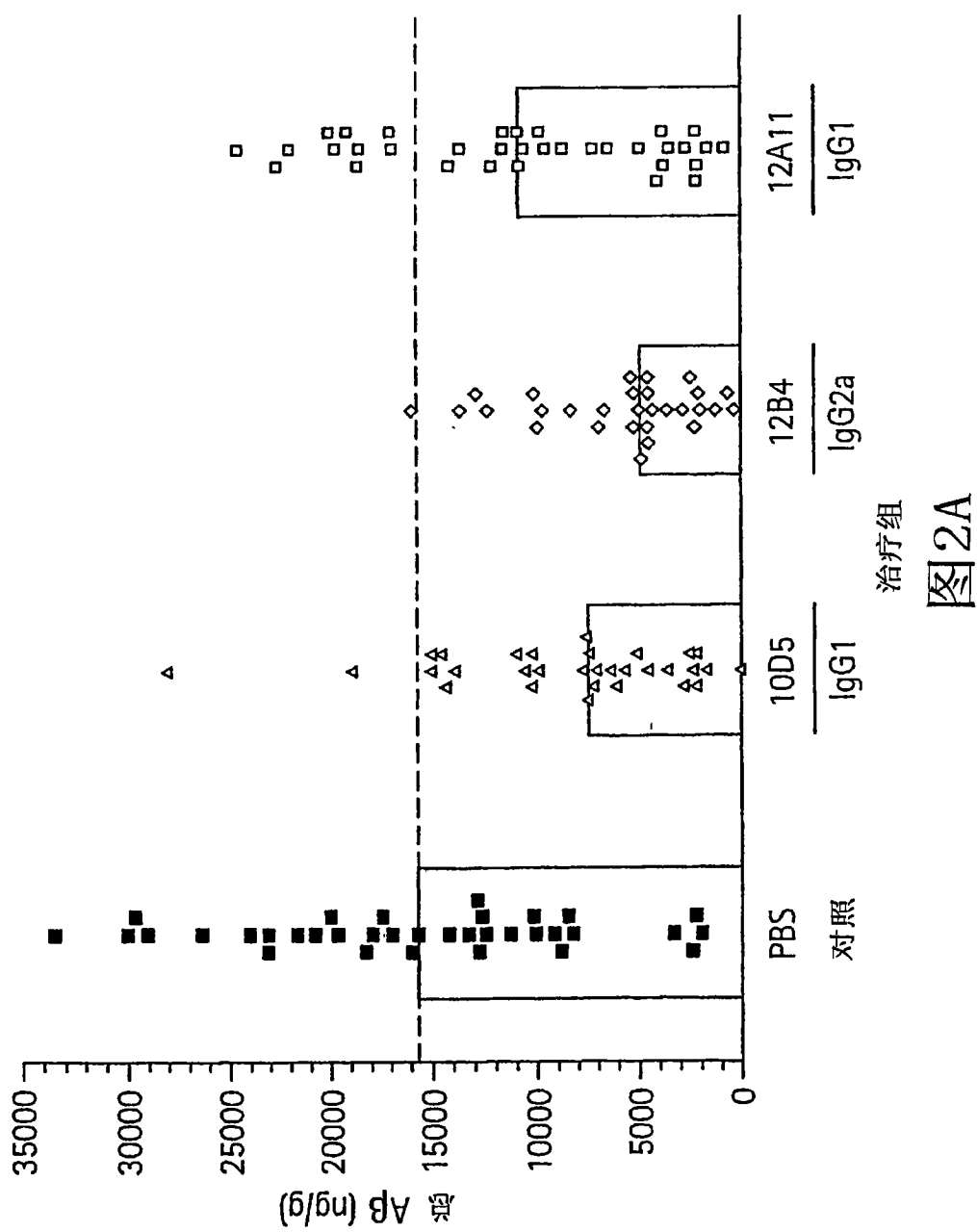


图 2A

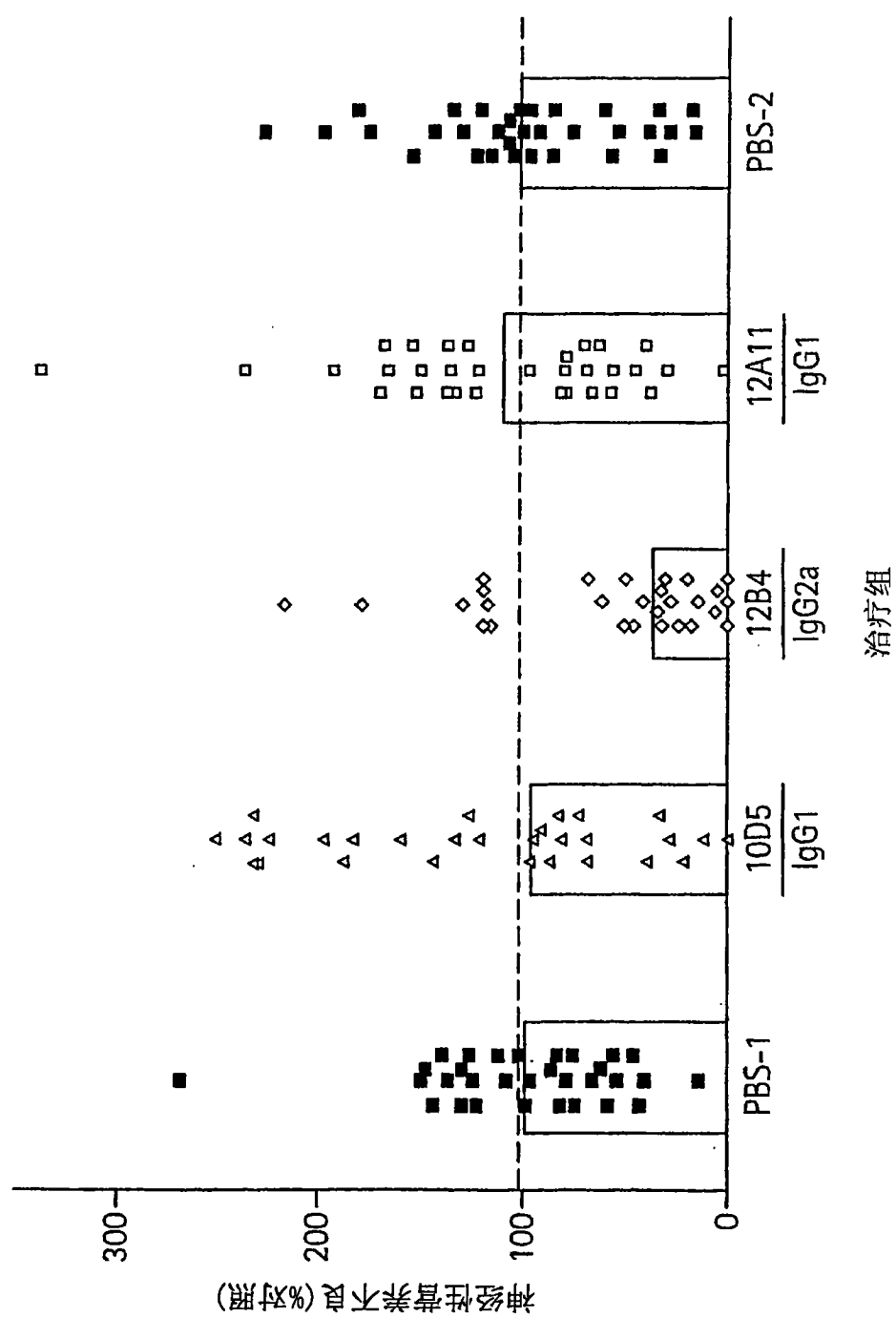


图 2B

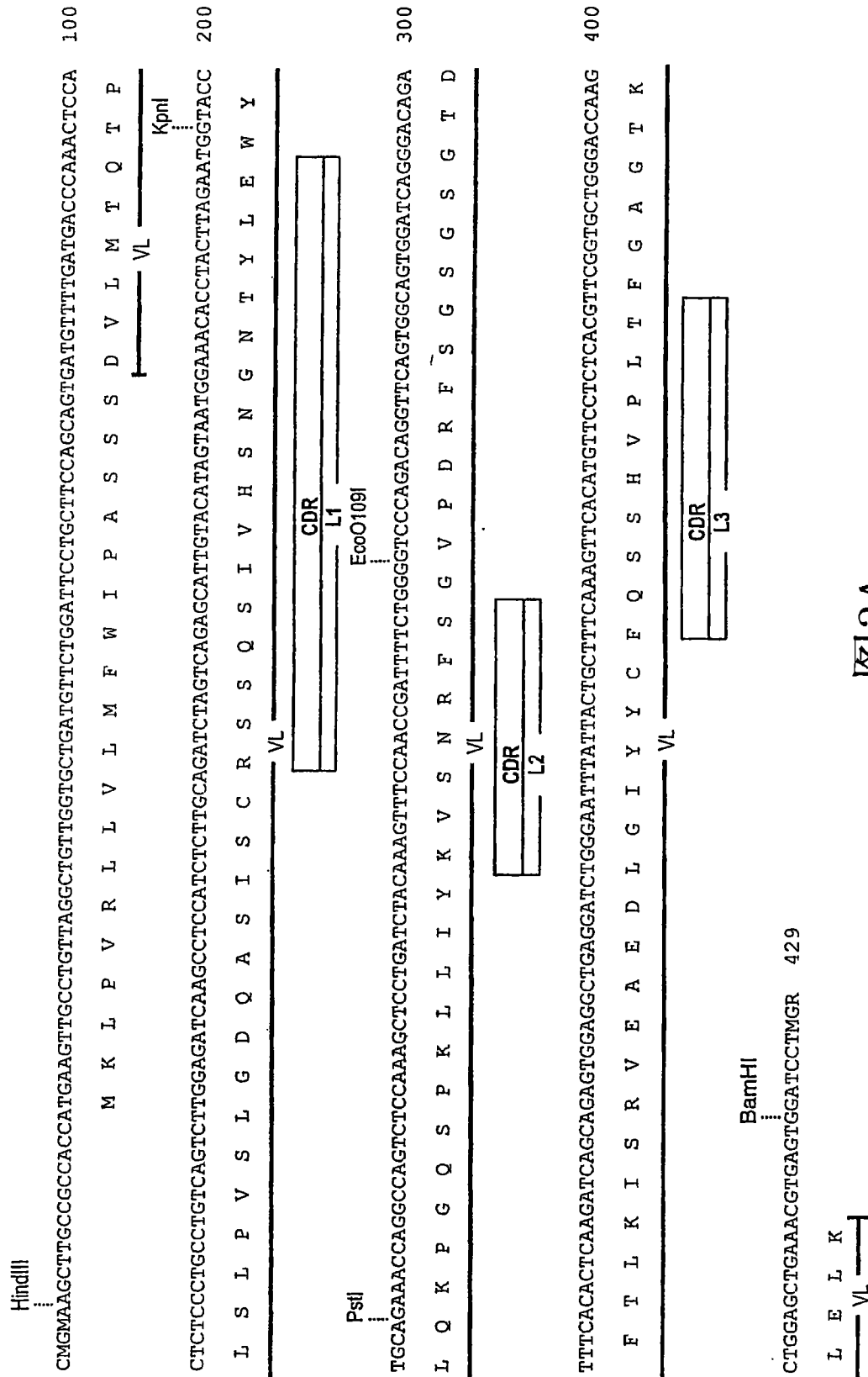
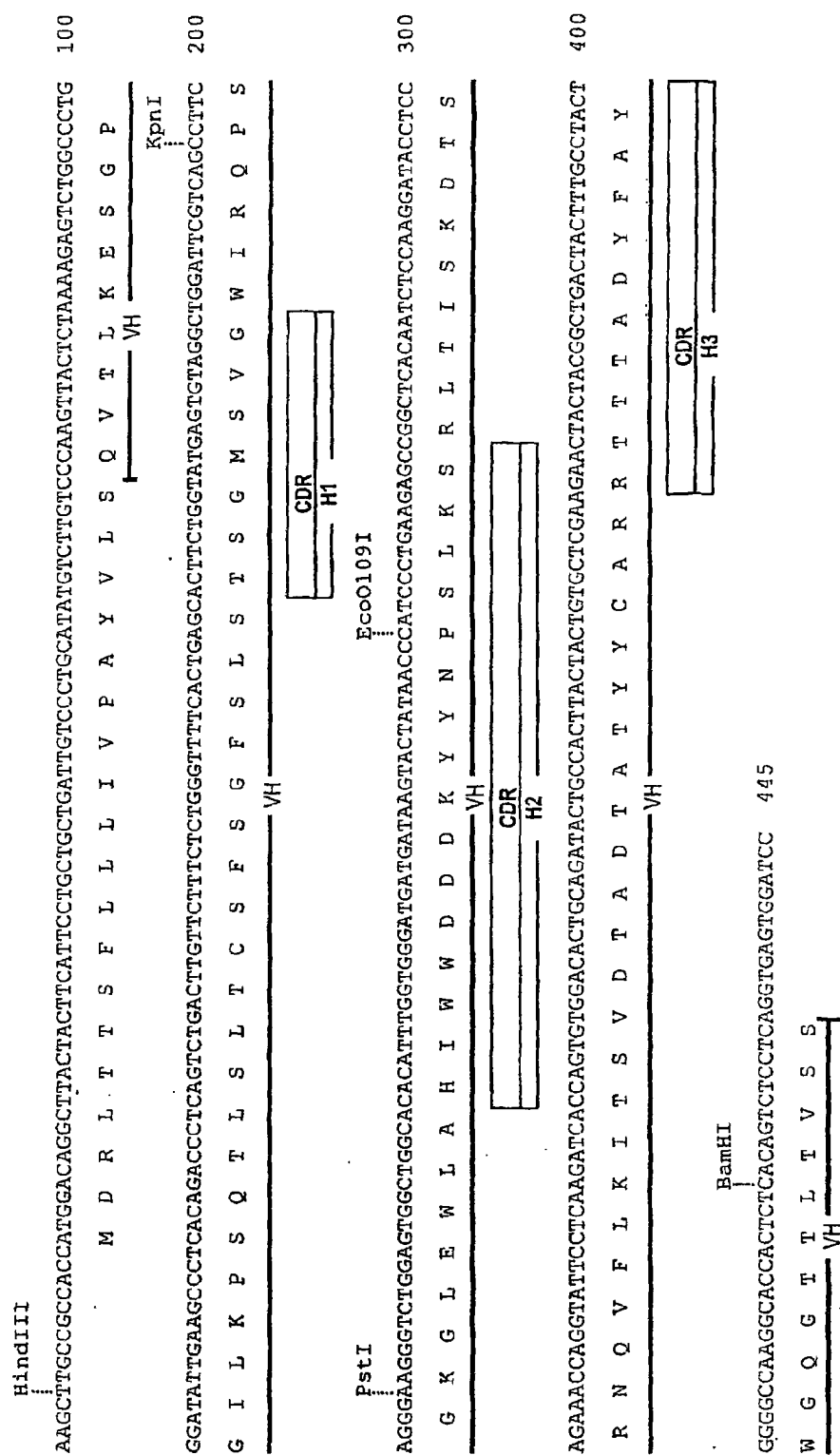


图3A



冬 3B

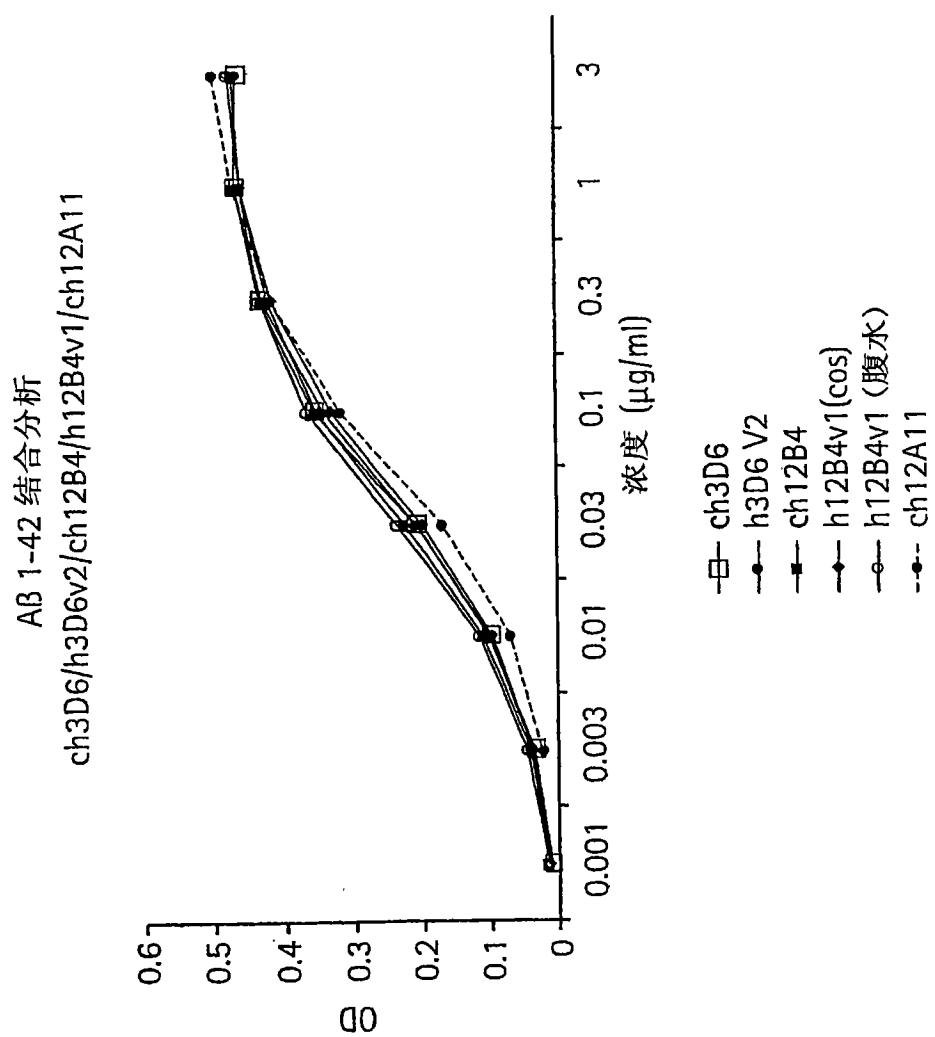


图4

[illegible]

5B

QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v1
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v2
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v2.1
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v3
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v4.1
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v4.2
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v4.3
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v4.4
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.1
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.2
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.3
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.4
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.5
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v5.6
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v6.1
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v6.2
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v6.3
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWVA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v6.4
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WVRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v7
QVQLVESGGGVVQPGRSRLRLSCAFSGFTLS	TSGMSVG	WIRQAPGKGLEWIA	HIWDDDDKYYNPSLKS	v8

图6A

R1TISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v1
RFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v2
RFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v2.1
RFTISRDNLSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v3
R1TISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v4.1
R1TISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v4.2
RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v4.3
R1TISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v4.4
R1TISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.1
RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.2
R1TISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.3
RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.4
R1TISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.5
RFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v5.6
RFTISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v6.1
R1TISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v6.2
RFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v6.3
RFTISKDTSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v6.4
R1TISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v7
R1TISKDTSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	RTTTADYFAY	WGQGTTVTVSS	v8

图6B

>vh design	A24F	T28S	F29L	V37I	V48L	F67L	R71K	N73T	L78V	-	版本	1
>vh design	A24F		F29L	V37I			R71K	N73T		-	版本	2
>vh design	A24F		F29L	V37I			R71K			-	版本	2.1
>vh design	A24F		F29L	V37I						-	版本	3
>vh design	A24F		F29L	V37I	V48L	F67L	R71K	N73T	L78V	-	版本	4.1
>vh design	A24F	T28S	F29L	V37I		F67L	R71K	N73T	L78V	-	版本	4.2
>vh design	A24F	T28S	F29L	V37I	V48L		R71K	N73T	L78V	-	版本	4.3
>vh design	A24F	T28S	F29L	V37I	V48L	F67L	R71K	N73T		-	版本	4.4
>vh design	A24F		F29L	V37I		F67L	R71K	N73T	L78V	-	版本	5.1
>vh design	A24F		F29L	V37I	V48L		R71K	N73T	L78V	-	版本	5.2
>vh design	A24F		F29L	V37I	V48L	F67L	R71K	N73T		-	版本	5.3
>vh design	A24F	T28S	F29L	V37I			R71K	N73T	L78V	-	版本	5.4
>vh design	A24F	T28S	F29L	V37I		F67L	R71K	N73T		-	版本	5.5
>vh design	A24F	T28S	F29L	V37I	V48L		R71K	N73T		-	版本	5.6
>vh design	A24F		F29L	V37I			R71K	N73T	L78V	-	版本	6.1
>vh design	A24F		F29L	V37I		F67L	R71K	N73T		-	版本	6.2
>vh design	A24F		F29L	V37I	V48L		R71K	N73T		-	版本	6.3
>vh design	A24F	T28S	F29L	V37I			R71K	N73T		-	版本	6.4
>vh design	A24F		F29L		V48L	F67L	R71K	N73T	L78V	-	版本	7
>vh design	A24F	T28S	F29L	V37I	V48L	F67L	R71K		L78V	-	版本	8

图6C

AB (1-42) 结合分析
ch12A11 vs h12A11 v1 vs. h12a11v2, v2.1, v3

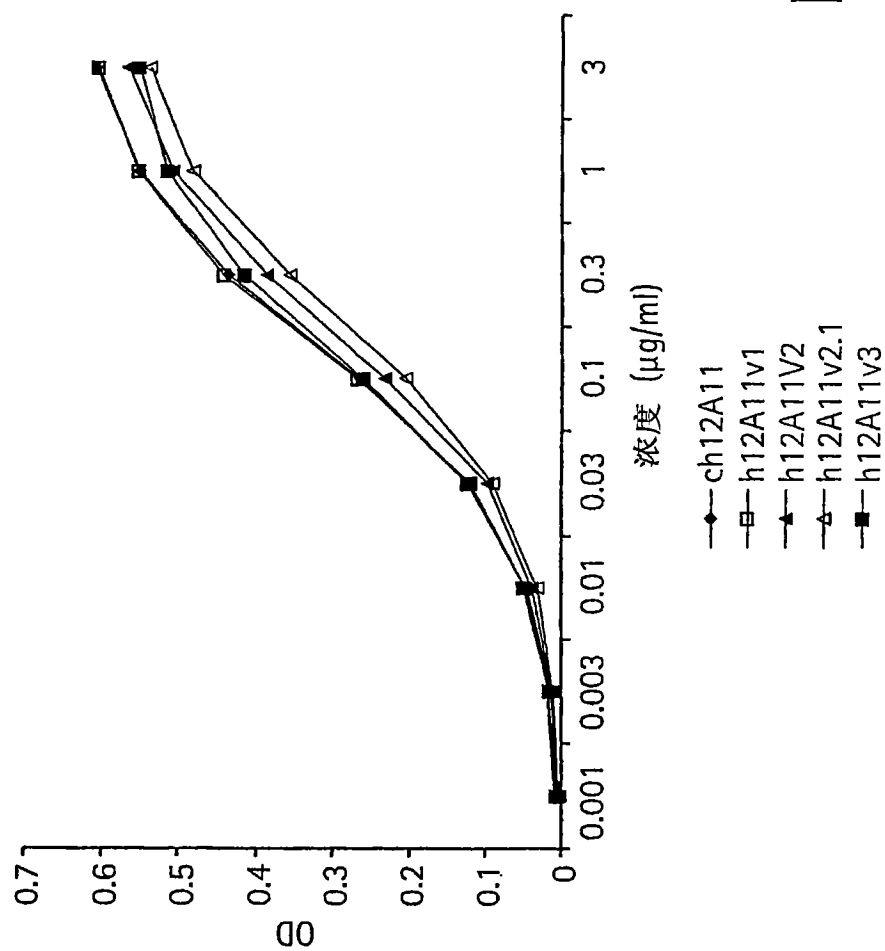


图7

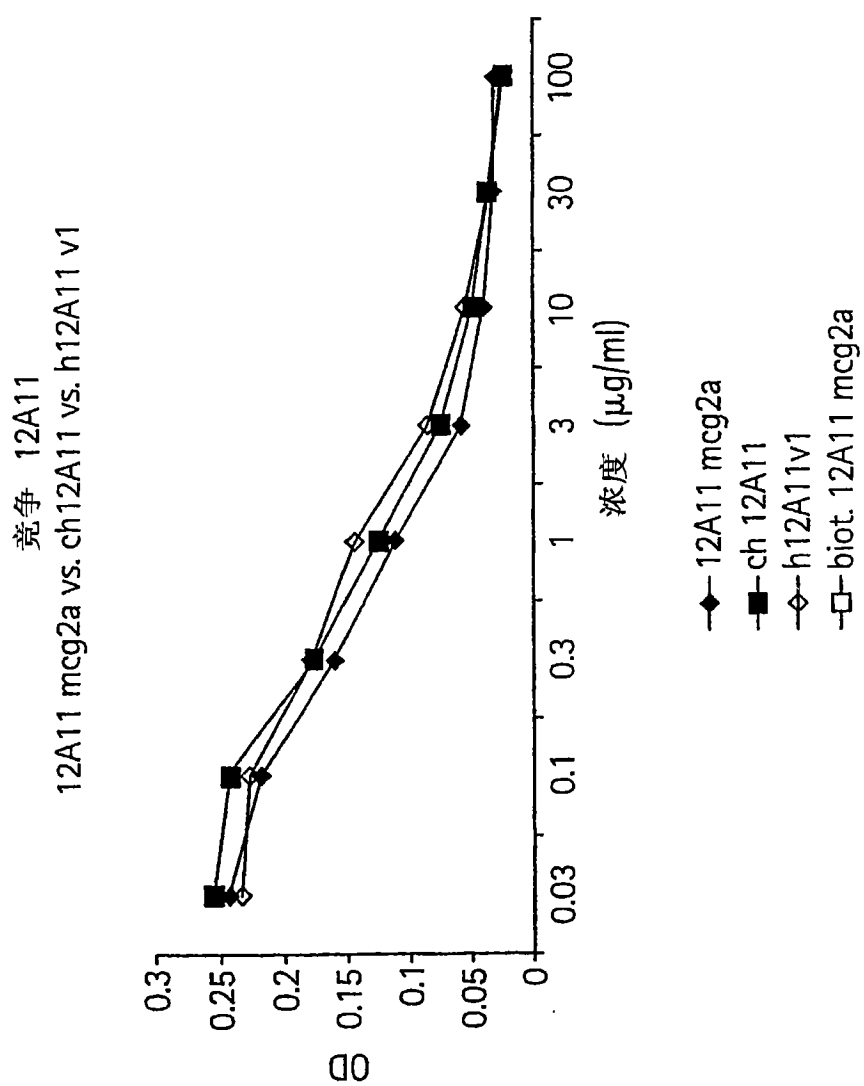


图 8

专利名称(译)	识别 β -淀粉样肽的人源化抗体		
公开(公告)号	CN1798766B	公开(公告)日	2012-05-30
申请号	CN200480015071.3	申请日	2004-06-01
[标]申请(专利权)人(译)	神经实验室有限公司 惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	神经实验室有限公司 惠氏公司		
当前申请(专利权)人(译)	杨森阿尔茨海默氏症免疫治疗公司 惠氏有限责任公司		
[标]发明人	古里奇巴锡		
发明人	古里奇·巴锡 乔斯·W·萨尔达尼亚 弗雷德里克·巴尔德		
IPC分类号	C07K16/00 C07K17/00 C12P21/08 A61K39/395 A61K39/40 A61K39/42 C07H21/04 C07K16/18 C07K16/44 C12P21/04 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	C07K16/18 C07K2317/567 C07K2317/565 C07K2317/92 C07K2317/77 A61K2039/505 C07K2317/56 C07K2317/24 A61P25/00 A61P25/28		
代理人(译)	杨青		
审查员(译)	于群		
优先权	60/474654 2003-05-30 US		
其他公开文献	CN1798766A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了改进的试剂和方法，用于治疗与病人脑中的A β 淀粉样沉积有关的疾病。优选的试剂包括抗体，例如人源化抗体。

